

Funktionelle Analysen von epithelialen Transmembranproteinen bei
Drosophila melanogaster

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ben Harder
aus Kehl

1. Referent:

Professor Dr. Hans-Henning Arnold

2. Referent:

apl. Professor Dr. Reinhard Schuh

eingereicht am:

29.10.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am:

09.01.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Harder B., Schomburg A., Pflanz R., Küstner K., Gerlach N., & Schuh R.

TEV protease-mediated cleavage in *Drosophila* as a tool to analyze protein functions in living organisms.

BioTechniques. 2008 May; 44 (6):765-772.

Diese Arbeit wurde von April 2005 bis Oktober 2008 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen unter freundlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Schuh in der Forschungsgruppe „Molekulare Organogenese“ angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans-Henning Arnold für seine Unterstützung, Hilfeleistung und Betreuung dieser Arbeit an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Schuh für seine freundliche und professionelle Anleitung sowie seinen kritischen Reflexionen und seinem stetigen Einsatz für mich und meine Arbeit.

Ich danke weiterhin meinen Kollegen für Unterstützung, Humor sowie Rat und Tat. Besonders hervorzuheben sind Dr. Robert Kittel, Wernher Fouquet, Dr. Ralf Pflanz, Dr. Alf Herzig, Dr. Ulrich Schäfer, Dr. Ulrich Nauber, Toma Yakulov, Ufuk Günesdogan, Dr. Gerd Vorbrüggen, Tomma Eisbein, Katharina Küstner und Martin Jaspers.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle für seine freundliche Aufmerksamkeit und Hilfsbereitschaft bei wichtigen Fragen.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie und ganz besonders meiner Freundin Dr. Philine Keller. Ohne Ihre Liebe und Ihre einfühlsame Art wäre für mich vieles nicht möglich gewesen.

Diese Dissertation wurde mit großzügiger Unterstützung von der Studienstiftung des deutschen Volkes und von der Max-Planck-Gesellschaft gefördert.

1 Einleitung	1
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> - ein Modell für den Menschen	1
1.1.1 Die Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	2
1.1.2 Epithelien in <i>Drosophila</i>	4
1.1.3 Das Tracheensystem von <i>Drosophila</i>	5
1.1.4 Claudine etablieren die transepitheliale Barriere in <i>Drosophila</i>	8
1.2 Aspekte der neuronalen Funktion von <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.2.1 Die neuromuskuläre Verbindung	10
1.2.2 Calcium-Kanäle in <i>Drosophila</i>	10
1.2.3 Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten	12
1.2.4 Erste Analysen des Gens <i>hot dog</i>	13
 2 Ergebnisse	 15
2.1 Das TEV-Protease-System in <i>Drosophila melanogaster</i>	15
2.1.1 Die Fragmentierung eines dTao-Fusionsproteins in KC ₁₆₇ -Zellen durch die TEV-Protease	17
2.1.2 Die zeitabhängige Fragmentierung eines CD8-Fusionsproteins in KC ₁₆₇ -Zellen durch die TEV-Protease	19
2.1.3 TEV-Protease-Expression und die Interferenz mit der Entwicklung von <i>Drosophila</i>	21
2.1.4 Die Fragmentierung eines dTao-Fusionsproteins in trachealen Plakoden durch die TEV-Protease	23
2.1.5 Die Fragmentierung eines Mega-Fusionsproteins in <i>Drosophila</i> -Embryonen durch die TEV-Protease	25
2.1.6 Die orts- und zeitabhängige Fragmentierung eines Mega-Fusionsproteins in <i>Drosophila</i> -Embryonen durch die TEV-Protease	27

2.1.7	Die gewebespezifische Untersuchung des Mega-C-Terminus in <i>Drosophila</i> -Embryonen mit dem TEV-Protease-System	29
2.1.8	Der Mega-C-Terminus beeinflusst nicht die Lokalisierung von <i>septate junctions</i> -Markerproteinen	32
2.1.9	Mega- Δ C-Term-Embryonen verfügen über eine transepitheliale Barriere im Tracheensystem	36
2.1.10	Die TEV-Protease-vermittelte Proteolyse von Mega-TEVpcs-C-Term erzeugt ein abnormales Chitinfilament im Tracheenlumen	39
2.1.11	Die TEV-Protease-vermittelte Proteolyse von Mega-TEVpcs-C-Term interferiert mit der Exozytose im Tracheensystem	43
2.1.12	Eine mit einem Signalpeptid erweiterte TEV-Protease wird in das Tracheenlumen sezerniert	45
2.2	Hot Dog ist eine putative Calcium-Kanal Gamma Untereinheit	46
2.2.1	Das Hot Dog-Protein besitzt Sequenzähnlichkeit mit dem <i>C. elegans</i> -Protein F53B3.5	46
2.2.2	Der <i>hot dog</i> mutante Phänotyp bei adulten Fliegen	49
2.2.3	<i>two-electrode-voltage-clamp</i> -Aufnahmen an neuromuskulären Verbindungen	50
2.2.4	Hot Dog ist an der neuromuskulären Verbindung von <i>Drosophila</i> -L3-Larven lokalisiert	53
3	Diskussion	55
3.1	<i>in vivo</i> Manipulation von Proteinen durch das TEV-Protease-System	56
3.2	<i>hot dog</i> codiert eine putative Calcium-Kanal Gamma Untereinheit in <i>Drosophila melanogaster</i>	67

4 Material und Methoden	69
4.1 Fliegenhaltung, Fliegen-genetik und molekulare Manipulation	69
4.1.1 Kreuzungen	69
4.1.2 Balancierung von transgenen Fliegenlinien	69
4.1.3 Dechorionierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	71
4.1.4 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	71
4.1.5 Mikroinjektion von Texas-Red-Dextran	71
4.1.6 Hitzeschock-vermittelte Genexpression	72
4.2 Zellkultur	73
4.2.1 Transfektion von <i>Drosophila</i> -Zellen	73
4.2.2 Expression von ektopischen Proteinen in Zellkultur	73
4.2.3 Antikörperfärbung von Zellkulturen	74
4.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken	74
4.3.1 Gewinnung genomischer DNA aus Fliegen	74
4.3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Kultur	74
4.3.3 Restriktionsverdau von DNA	75
4.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	75
4.3.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	76
4.3.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	76
4.3.7 Ligieren von DNA-Fragmenten	77
4.3.8 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	77
4.3.9 Polymerase-Kettenreaktion	77
4.3.10 TOPO-Reaktion mit DNA-Fragmenten	79
4.3.11 Anhängen von Adenosinmonophosphat-Überhängen an <i>blunt end</i> PCR-Produkte	79
4.3.12 Gerichtete Mutagenese von DNA-Sequenzen	80

4.3.13 Ligasefreie Klonierung mittels In-Fusion Reaktion	80
4.3.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden	80
4.3.15 Messung von Nukleinsäurekonzentrationen	81
4.3.16 Vorbereitung von DNA-Proben zur Sequenzierung	81
4.3.17 Herstellung von RNA-Sonden mittels <i>in vitro</i> Transkription	82
4.3.18 Herstellung von Embryolysaten	83
4.3.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	83
4.3.20 Detektion von Proteinen mittels <i>western blotting</i>	84
4.3.21 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	85
4.3.22 Herstellung polyklonaler Antikörper	85
4.4 Histologische Arbeitstechniken	86
4.4.1 Fixierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	86
4.4.2 Präparation von <i>Drosophila</i> -L3-Larven	86
4.4.3 Antikörperfärbungen an <i>Drosophila</i> -Embryonen und <i>Drosophila</i> -Larven	87
4.4.4 Färbung von <i>Drosophila</i> -Embryonen mit Chitin-binding Probe	88
4.4.5 <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	88
4.5 Erhebung der Daten	89
4.5.1 Konfokale Mikroskopie	89
4.5.2 Epifluoreszente Mikroskopie	89
4.5.3 Elektrophysiologie an <i>Drosophila</i> -L3-Larven	89
4.5.4 <i>in silico</i> Sequenzanalyse	90
4.5.5 Bildbearbeitung	90
4.5.6 Videoaufnahmen	90
4.6 Material	91
4.6.1 Verwendete Fliegenlinien	91
4.6.2 Verwendete <i>Drosophila</i> -Zelllinien	92

4.6.3	Verwendete <i>E. coli</i> -Zelllinien	92
4.6.4	Medien	93
4.6.5	Puffer und Lösungen	93
4.6.6	Chemikalien	96
4.6.7	Enzyme, Reagenzien und Kits	98
4.6.8	Geräte	99
4.6.9	Vektoren	100
4.6.10	<i>Primer</i>	101
4.6.11	Antikörper und Färbemittel	106
4.6.12	Abkürzungen	109
 5 Referenzen		 111
 6 Zusammenfassung		 124

„Das Schönste, was wir entdecken können, ist das
Geheimnisvolle.“

Albert Einstein

1 Einleitung

1.1 *Drosophila melanogaster* - ein Modell für den Menschen

Der Drang der Menschheit, Dinge in Ihrem Innersten zu verstehen und zu verändern, ist so alt wie sie selbst. Seit langer Zeit wird in mannigfaltigen Disziplinen geforscht, um des Menschen Wohlergehen zu steigern. Im besonderen Fokus war hierbei stets die medizinische Forschung. Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckte man an *Drosophila melanogaster* (*Drosophila*, Die schwarzbäuchige Taufliege) verschiedene genetisch vererbare Merkmale und begann diese zu untersuchen. Zuerst als Objekt zoologischen Interesses beachtet, hat sich nach über 100 Jahren Forschung *Drosophila* zu einem der bestuntersuchten und beliebtesten Modellorganismen der gegenwärtigen Zeit etabliert. Es wurde verständlich, dass viele molekulare und biochemische Prozesse in der Fliege ähnlich mit denen im Menschen sind. Seit dem Jahre 2000 ist die komplette DNA-Sequenz des gesamten Fliegen-genoms verfügbar, ein mittlerweile unverzichtbares Werkzeug für die Erkundung unbekannter zellulärer Prozesse auf genetischer und biochemischer Ebene. Dazu kommen eine Reihe von manipulativen, biotechnologischen Techniken, die es ermöglichen, Proteine in ihrer Gestalt, Zusammensetzung oder Lokalisierung zu beeinflussen. Dies alles macht *Drosophila* zu einem idealen Objekt der Grundlagenforschung und medizinisch orientierten Studien. Dennoch gibt es eine Nachfrage nach neuen Methoden, um Analysen voranzutreiben, die mit den verfügbaren Werkzeugen nicht oder nur schwer durchführbar sind. Wir werden sehen, dass gerade bei *Drosophila* noch Potential zur Entwicklung von neuen Techniken und neuen Fragestellungen vorhanden ist, und wie ein solches System zur Anwendung kommen kann. Befassen wir uns aber zunächst einmal genauer mit *Drosophila*, damit biologische Zusammenhänge verständlich werden können.

1.1.1 Die Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster gehört zu der Ordnung der *Dipteren*. Diese Fliegenart zeichnet sich durch eine schnelle Generationszeit aus. So ist diese innerhalb von 10 Tagen bei 25°C einmal durchlaufen. Jedes Weibchen kann bis zu 400 Eier legen, die von einem Chorion und einer Vitellinmembran umhüllt sind. Nach der Befruchtung vollzieht sich die Embryogenese über einen Zeitraum von etwa 22 Stunden bis eine Larve schlüpft. Nach dem letzten Stadium verpuppt sich die Larve, und es entwickelt sich in vier Tagen die Imago. Diese erreicht etwa 12 Stunden später die Geschlechtsreife und der Kreislauf beginnt von neuem (Wolpert L., Principles of Development. 1998: Erste Auflage. Oxford: Oxford University Press; Greenspan RJ., Fly Pushing. 2004: S. 21, Zweite Auflage. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press und Seyffert W., Lehrbuch der Genetik. 1998: Erste Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer).

Bei der Befruchtung dringt ein Spermium durch die Mikropyle, ein kegelförmiger Fortsatz, in das Ei ein und es kommt zu einer Fusion des Spermiums mit dem Ei-Nukleus. Die nun entstandene Zygote durchlebt eine Reihe schneller mitotischer Teilungen, jedoch ohne die Zytoplasmen aufzuteilen. So entsteht ein Synzytium in dem alle Kerne miteinander in Verbindung stehen. Einige Nuklei erreichen bei der neunten Teilung den posterioren Pol des Embryos und bilden die Polzellen. Aus diesen werden sich zu einem späteren Zeitpunkt die Keimbahnzellen entwickeln. Nach 13 Kernteilungen entsteht durch Zellularisierung aus dem synzytialen Blastoderm das zelluläre Blastoderm. Hierbei erreichen die Kerne die Peripherie des Eies und werden von Mikrotubuli, Mikrofilamenten und einer Zellmembran umgeben. Die entstandene epitheliale Schicht besteht aus etwa 6000 Zellen, aus denen sich alle späteren Gewebe entwickeln werden. Die Gastrulation beginnt bei *Drosophila* etwa drei Stunden nach der Befruchtung während der *midblastula transition*. Endodermale und mesodermale Gewebe nehmen ihre Position im Inneren des Embryos ein, während das ektodermale Gewebe als außenliegende

Schicht diese umgibt. Man kann die Bildung des Nervensystems beobachten. Der Mitteldarm formiert sich aus einem anterioren und posterioren Ende, wird anschließend von ektodermalem Vorder- und Hinterdarm begrenzt, und die Epidermis sowie das Tracheensystem entstehen. Das Keimband erscheint, erfährt eine Verlängerung („*germ-band-extension*“) und zieht sich gegen Ende der Embryogenese wieder zurück. Während der Verlängerung des Keimbandes kommt es zur ersten Segmentierung des Embryos. Es werden Furchen sichtbar, die Parasegmente abgrenzen. Diese entwickeln sich nachfolgend zu echten Segmenten. Die Steuersignale hierbei sind maternale Effektgene, Segmentationsgene (*gap*-Gene, Paarregel-Gene, Segmentpolaritäts-Gene) und homöotische Gene (vergleiche Gilbert S., *Developmental Biology*. 2000: Sechste Auflage. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.). Nach der Organogenese schlüpft die Larve bei 25°C etwa 22 Stunden nach der Befruchtung. Strukturen, die am weitesten anterior der Kopfreion liegen, nennt man Acron. Strukturen, die am weitesten posterior des Organismus liegen, bilden das Telson. Dazwischen befinden sich drei Thorax-Segmente und acht Abdominalsegmente. Mit der Nahrungsaufnahme wächst die Larve und häutet sich insgesamt zwei Mal. Jedes der drei Larvenstadien (L1, L2 und L3) wird mit „*instar*“ eins, zwei oder drei bezeichnet. Eine *Drosophila*-Larve hat keine Extremitäten. Um ein flug- und fortpflanzungsfähiges Insekt zu werden, ist eine letzte Verwandlung nötig. Diese finale Metamorphose zur vollständigen Fliege findet nach dem letzten Larvenstadium statt und wird durch Hormone eingeleitet. Strukturen einer adulten Fliege wie Antennen, Augen, Beinchen, Halteren, Flügel oder Genitalien sind in der Larve als dünne Gewebescheiben, bestehend aus je etwa 40 Zellen, Imaginalscheiben genannt, angelegt und entwickeln sich während des Puppenstadiums (Wolpert L., *Principles of Development*. 1998: Erste Auflage. Oxford: Oxford University Press).

1.1.2 Epithelien in *Drosophila*

Die mit dieser Arbeit vorgelegte Studie basiert maßgeblich auf Verwendung des *Drosophila*-Gens *megatrachea*. Dieses ist für die wildtypische Entwicklung des epithelialen Tracheensystems essenziell. Es soll an dieser Stelle auf Epithelien und die Entwicklung des Atmungsorgans der Taufliege eingegangen werden, um die Funktion dieses Gens zu erläutern.

Epithelien sind feste Zellverbände, die eine Barriere zur Umgebung darstellen. Die extrazelluläre Matrix ist bei Epithelien dünn ausgebildet und formt die sogenannte Basallamina. Epitheliale Gewebe sind Zellschichten, die den Körper in physiologisch differenzierte Kompartimente unterteilen. Diese Tatsache ist eine fundamentale Bedingung zur Entwicklung komplexer biologischer Strukturen und Körperarchitekturen. Epithelien sind als schützende Schicht auf Bindegeweben zu finden (Alberts M., Molecular Biology of The Cell. 2002: S. 1065 ff., Vierte Auflage. New York: Garland Publishing). Die Plasmamembran der epithelbildenden Zellen ist polarisiert, d. h. in verschiedene Domänen eingeteilt, die jeweils spezifische Funktionen besitzen. Die Einteilung erfolgt in eine apikale Domäne mit direktem Kontakt zur äußeren Umgebung und eine basolaterale Domäne, die Zellen miteinander und dem unterliegenden Gewebe verbindet. Diese basolaterale Domäne unterteilt sich weiterhin in die laterale (Zell-Zell-Kontakt) und die basale Region (auf der Basallamina sitzend). An der lateralen Domäne

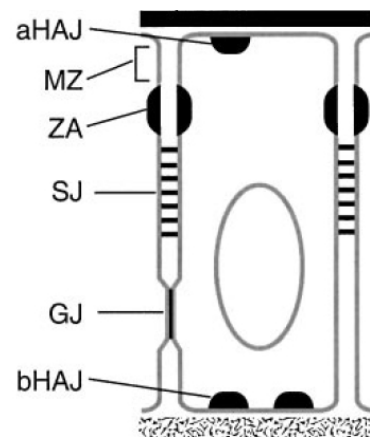


Abb. 1.1.2 Darstellung einer ektodermalen epithelialen Zelle bei *Drosophila melanogaster*

Zu erkennen ist der schematische Ausschnitt aus einem Epithel. Es ist eine Zelle mit ihren Zell-Zell-Kontakten zu sehen. Die apikale Seite mit der Kutikula (schwarz) befindet sich oben, die basale Seite mit der Basallamina (grau) unten. Die laterale Domäne ist durch die apikalen *hemi adherens junctions* (aHAJs), die Marginale Zone (MZ), den *adherens junctions* (zonula adherens, ZA), den *septate junctions* (SJs), den *gap junctions* (GJs) und die basalen *hemi adherens junctions* (bHAJs) gekennzeichnet. Es handelt sich hier um ein polarisiertes Gewebe (Tepass U. et al., 2001)

befinden sich bei *Drosophila* Zellverbindungen (Abb. 1.1.2) wie die *adherens junctions* (AJs), *septate junctions* (SJs) und *gap junctions* (Tepass U. & Hartenstein V., 1994; Lauf U. *et al.*, 2002; Tepass U. *et al.*, 2001).

1.1.3 Das Tracheensystem von *Drosophila*

Das der Sauerstoffversorgung dienende Tracheensystem von *Drosophila melanogaster* ist ein einlagiges, epitheliales Gewebe, das aus etwa 1600 Zellen besteht. Dieses Netzwerk aus Röhren ist zum Lumen hin mit einer Kutikula abgegrenzt, die einen Schutz vor Dehydrierung und Pathogenen darstellt. Zur anderen Seite hin existiert eine Basallamina (Uv A. & Samakovlis C., Comprehensive Molecular Insect Science. 2004, Vol. 2). Das Tracheensystem bietet die Möglichkeit, zelluläre und molekulare Vorgänge, die zur Entstehung tubulärer Netzwerke führen, zu untersuchen. Seine Aufgabe besteht darin, den Gastransport durch Diffusion von und zu Körpergeweben sicherzustellen. Die Bildung des Tracheensystems beginnt vier Stunden nach Befruchtung des Eies. Dies geht mit der Differenzierung trachealer Zellgruppen (tracheale Plakoden) aus lateralen epidermalen Zellen einher (Abb. 1.1.3 A). Die 20 trachealen Plakoden oder auch Metamere, bestehen aus etwa 80 Zellen, die sich bis zum Ende der embryonalen Tracheenmorphogenese nicht weiter teilen. Durch koordinierte Zellbewegungen invaginieren die Metamere in das Innere des Embryos und bilden dort röhrenförmige Tracheenäste aus, die sich nach einem spiegelbildlichen Muster verzweigen (Abb. 1.1.3 B). Bestimmte Tracheenäste wachsen in Richtung der benachbarten Tracheenmetamere aus und fusionieren transversal mit den Tracheenästen der Nachbarsegmente (Abb. 1.1.3 C). Durch weitere dorsale und ventrale Verbindungen der Tracheen entsteht ein dreidimensionales Netzwerk (Abb. 1.1.3 D). Die Bildung einzelliger, sekundärer und terminaler Tracheenäste, die im direkten Kontakt zum Zielgewebe sind und dieses mit Sauerstoff versorgen, stellt den Endpunkt der embryonalen Tracheenentwicklung

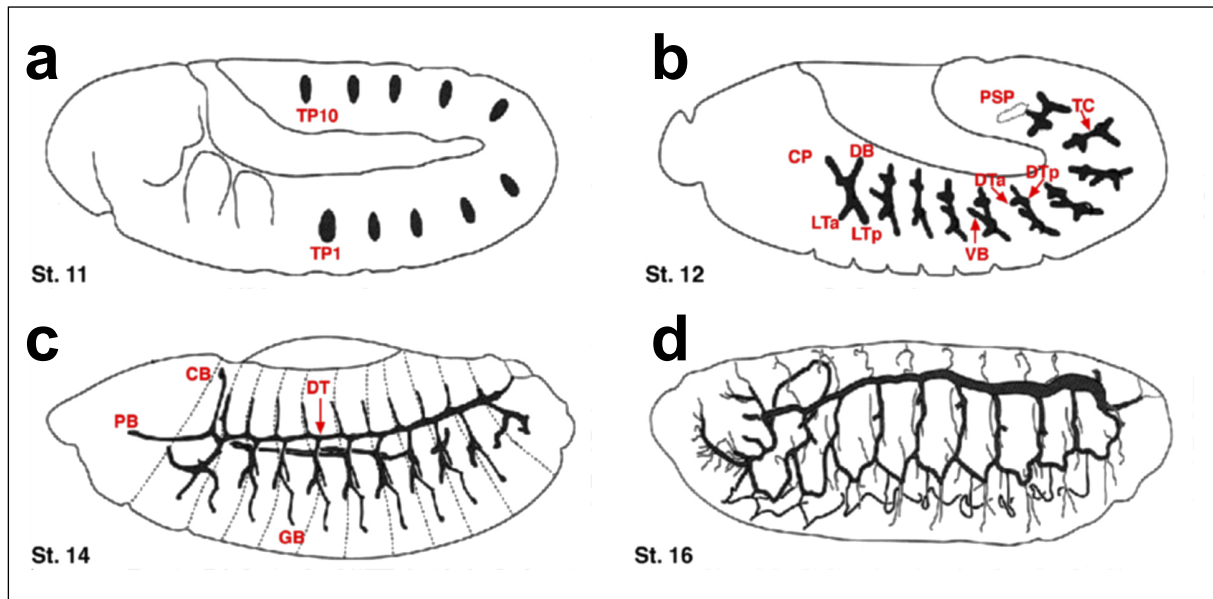


Abb. 1.1.3 Die embryonale Tracheenmorphogenese von *Drosophila melanogaster*

(A) Tracheale Plakoden im ausgestreckten Keimstreif. Der Anfang der Tracheenmorphogenese beginnt mit der Invagination ektodermaler Zellen im Stadium 11. (B) Beginn des primären Auswachsens der Tracheenäste während der Keimstreifverkürzung. Die Zellen der segmental angelegten Tracheenplakoden bilden ab Stadium 12 stereotypisch sechs fingerartige Ausläufer, die während der weiteren Entwicklung elongieren und bereits im Stadium 14 (C) am dorsalen Hauptstamm miteinander fusionieren. Weitere tracheale Äste wachsen kurz vor der Keimstreifverkürzung nach einem definierten Muster aus, um die Versorgung von Zielgeweben wie Viszerum und Nervensystem zu gewährleisten. (D) Primäre Tracheenäste kurz nach der Fusion mit ihren Partnern. Bis zum Ende des Stadiums 16 ist ein komplexes Netzwerk aus Tracheen entstanden. Nun wachsen von spezifischen Zellen ausgehend terminale Äste bis hin zu einzelnen Zielzellen aus. CB: Ast des Gehirns, DB: dorsaler Ast, DT: dorsaler Hauptstamm (*dorsal trunk*), DTa: anteriorer dorsaler Stammast, DTp: posteriorer dorsaler Stammast, GB: ganglionischer Ast, LTa: anteriorer lateraler Ast, LTp: posteriorer lateraler Ast, PB: Ast des Schlundes, TC: transversale Verbindung, TP: tracheale Plakode, VB: viszeraler Ast, PSP: posteriores Spirakel. Anterior ist links und dorsal ist oben (nach Manning G. & Krasnow MA., in Bate M. & Martinez Arias A., *The Development of Drosophila melanogaster*. 1993: S. 609-685, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krause C., Dissertation Kassel 2003; Adryan B., Dissertation Braunschweig 2004).

dar. Die Tracheenmorphogenese läuft nach einem stereotypen, ontogenetisch reproduzierbaren Muster ab. Das Tracheensystem kann somit auch als Modell für andere tubuläre Strukturen dienen (Affolter M. & Shilo BZ., 2000; Manning G. & Krasnow MA., in Bate M. & Martinez Arias A., *The Development of Drosophila melanogaster*. 1993: S. 609-685, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Im Lumen des Tracheensystems befindet sich während der Entwicklung ein Chitinfilament, das essenziell für dessen korrekte Ausbildung ist (Tonning A. *et al.*, 2005). Es wurden des Weiteren zwei wichtige Proteine, Serpentine und Vermiform, entdeckt, die für die korrekte Strukturierung des Filaments und somit auch des

Tracheensystems verantwortlich sind. Serpentine und Vermiform sind in das Tracheenlumen sezernierte Chitin-Deacetylasen und prozessieren dort Chitin zu Chitosan. Wenn diese Funktion fehlt, bildet sich das Chitinfilament nicht wildtypisch aus und es entstehen elongierte Tracheenäste (Luschnig S. *et al.*, 2006).

Das Tracheensystem stellt eine Barriere dar. Dieses Epithelium grenzt als tubuläre Struktur morphologisch und physiologisch das Körperinnere vom Lumen ab. In Vertebraten sind spezielle Zellstrukturen, die *tight junctions* (TJs), dafür verantwortlich, eine unkontrollierte Passage von Wasser, sonstigen Molekülen oder Immunzellen durch Epithelien zu verhindern (Furuse M. *et al.*, 1998; Morita K. *et al.*, 1999; Cereijido M., 1993). Hierbei ist die Proteinfamilie der Claudine maßgeblich am Aufbau der Struktur dieser Zellverbindung und der *barrier function* beteiligt (Peacock RE. *et al.*, 1997). Claudine sind Transmembranproteine mit vier Transmembrandomänen. Die spezifische Kombination dieser ergibt die jeweilige gewebespezifische Permeabilität (Tsukita S. & Furuse M., 2002). In *Drosophila* existiert eine ähnliche molekulare Barriere. Diese trifft man z. B. im Tracheensystem an. Hier wird die parazelluläre Barriere durch die *septate junctions* (SJs) etabliert, die das Arthropodenanalog der TJs darstellen. SJs bilden elektronenmikroskopisch sichtbar eine leiterartige Struktur aus (Noirot-Timotheé C. *et al.*, 1982; Tepass U. & Hartenstein V., 1994). Man unterscheidet zwei verschiedene Arten von SJs. Zum einen spricht man von *pleated*-SJs, die für ektodermal abgeleitete Gewebe charakteristisch sind und zum anderen von *smooth*-SJs, die in endodermalen Geweben zu finden sind (Tepass U. & Hartenstein V., 1994). Es wurde vermutet, dass SJs bei der Zellproliferation, der Zelladhäsion, der Zellkommunikation, der Zellpolarität und bei der Exozytose eine entscheidende Rolle spielen (Woods DF. *et al.*, 1996; Bilder *et al.*, 2000; Tepass U. *et al.*, 2001; Wang S. *et al.*, 2006).

1.1.4 Claudine etablieren die transepitheliale Barriere in *Drosophila*

Claudine sind Transmembranproteine, die der PMP-22/EMP/MP20/Claudin-Familie zugeordnet sind (Van Itallie CM. & Anderson JM., 2004). In *Drosophila* wurde 2003 das erste Claudinhomolog entdeckt (Behr M. *et al.*, 2003). Es wurde in Konvention nach dem mutanten Phänotyp benannt: *megatrachea* (*mega*), große Trachee (Abb. 1.1.4). In *mega*-Mutanten lässt sich ein vergrößertes und elongiertes Tracheensystem erkennen, das sich durch eine veränderte Zellform, zerstörte SJs und fehlender *barrier function* auszeichnet. Des Weiteren sind Markerproteine der SJs wie Neurexin (Baumgartner S. *et al.*, 1996), Fasciclin III (Woods DF *et al.*, 1997) und Coracle (Fehon RG. *et al.*, 1994) misslokalisiert. *mega*-Mutanten sind nur bis zum embryonalen

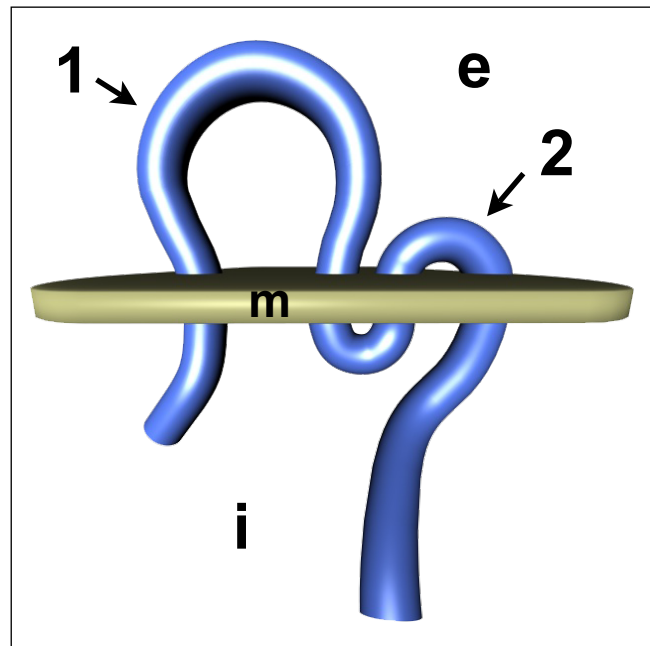


Abb. 1.1.4 Das Schema von Megatrachea

Dargestellt ist das Schema des Transmembranproteins Megatrachea. Dieses Protein verfügt über vier Transmembrandomänen in der Membran (m), zwei Domänen (1 und 2) in der extrazellulären Matrix (e) sowie drei Domänen, die intrazellulär (i) ins Zytoplasma orientiert sind (nach Behr M. *et al.*, 2003).

Stadium 17 lebensfähig. Megatrachea ist ein Transmembranprotein mit vier Transmembrandomänen, drei putativen intrazellulären Domänen und zwei putativen extrazellulären Domänen in Schleifenform (Behr M. *et al.*, 2003). Es gibt in *Drosophila* offenbar eine Gruppe von claudinähnlichen Proteinen. Diese sechs Proteine wurden *in silico* durch BLAST-Suche und ClustalW-Analyse gefunden und werden zur Zeit genauer untersucht (Behr M. *et al.*, 2003; Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Darunter befindet sich Hot Dog als ein außergewöhnlicher Vertreter der claudinähnlichen Proteine. In einem eigenen Kapitel wird noch weiter auf dieses Protein eingegangen.

Es ist noch nicht untersucht, welche Proteindomänen von Mega mit welchen molekularen Funktionen in der Zelle assoziiert sind oder wie der mutante Phänotyp molekular zu erklären ist. Auch war bisher nicht bekannt, ob die tatsächliche Orientierung in der Membran mit den *in silico* Vorhersagen übereinstimmt. Untersuchungen zeigten, dass eine Deletion des C-Terminus von Mega zu Letalität führt. Dies liegt darin begründet, dass diese verkürzte Form nicht in die Zellmembran eingebaut wird (Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Es war daher nicht möglich, die Funktion des C-Terminus von Mega in *Drosophila* zu untersuchen. Hilfreich wäre es, wenn eine Methode existieren würde, mit der man den C-Terminus (und darüber hinaus noch andere Abschnitte) nach dem Einbau des kompletten Mega-Moleküls in die SJs untersuchen könnte. Es gibt zwar eine Reihe von Methoden, mit denen die Expression von Proteinen manipuliert werden kann, wie etwa dem GAL4/UAS-System (Brand AH. & Perrimon N., 1993; Duffy JB., 2002), RNA-Interferenz (Kennerdell JR. & Carthew RW., 2000; Dietzl G. *et al.*, 2007) oder Mosaik-Analyse durch mitotische Rekombination (Xu T. & Rubin GM., 1993). Das gemeinsame Prinzip dieser Methoden ist jedoch die Manipulation der Gentranskription. Der Nachteil besteht darin, dass Genprodukte posttranslational nicht direkt verändert werden können. Daher war es mein Ziel, eine neue Methode der Protein-Interferenz zu entwickeln, die es mir ermöglicht, einzelne Domänen von Mega und anderen Proteinen in lebenden *Drosophila*-Fliegen nach deren Translation und subzellulären Transport zu untersuchen.

1.2 Aspekte der neuronalen Funktion von *Drosophila melanogaster*

Das Protein Hot Dog war schon Gegenstand der Analysen während meiner Diplomarbeit (2005). Im Verlauf der Untersuchungen offenbarte sich eine Funktion im Nervensystem von *Drosophila melanogaster*. Ich möchte nun eine Einführung in die Materie geben und dieses interessante Protein vorstellen.

1.2.1 Die neuromuskuläre Verbindung

Das Verständnis neuronaler Netzwerke und synaptischer Plastizität ist für die Neurobiologie sehr wichtig. Es besteht somit die Notwendigkeit, Kenntnis über die molekulare Zusammensetzung von Nervenverbindungen zum einen auf morphologischer und zum anderen auf molekularer Ebene zu erlangen. In *Drosophila* dienen Synapsen als Schnittstelle zwischen einzelnen Neuronen und auch Muskeln. Auf der präsynaptischen Seite sitzen Strukturen, die für die Ausschüttung von Neurotransmittern aus angedockten Vesikeln verantwortlich sind. Diese präsynaptische Region wird als aktive Zone (*cytoplasmic active zone*, CAZ) bezeichnet. Die postsynaptische Seite enthält Rezeptoren für Neurotransmitter, um eingehende Signale weiterzuleiten (Atwood HL. *et al.*, 1993; Rheuben MB. *et al.*, 1999). Diese nachgeschaltete Struktur nennt man *postsynaptic density* (PSD; Rodesch CK. & Broadie K., 2000; Rose D. & Chiba A., 2000).

Die neuromuskuläre Verbindung, *neuromuscular junction* (NMJ), von *Drosophila* dient der Erforschung der Interaktion von Neuronen als Modell, da diese vergleichsweise einfach aufgebaut und leicht zugänglich ist. Sie ist ein glutamaterges Modell und steht damit im Kontrast zu Vertebraten NMJs, die weitgehend acetylcholinabhängig sind (Sanes JR. & Lichtman JW., 2001). Arthropoden-NMJs sind daher eher mit Synapsen des zentralen Nervensystems von Vertebraten zu vergleichen, die glutamaterge Neuronen aufweisen (Sigrist SJ. *et al.*, 2000).

1.2.2 Calcium-Kanäle in *Drosophila*

Durch Spannung gesteuerte Calcium-Kanäle vermitteln den kontrollierten Einfluss von Calcium-Ionen aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse. Dadurch kommt es an deren Membran zu einer Depolarisierung und somit zur Neurotransmission durch Transmitterausschüttung (Neher E., 1998; Schneggenburger R. & Neher E.,

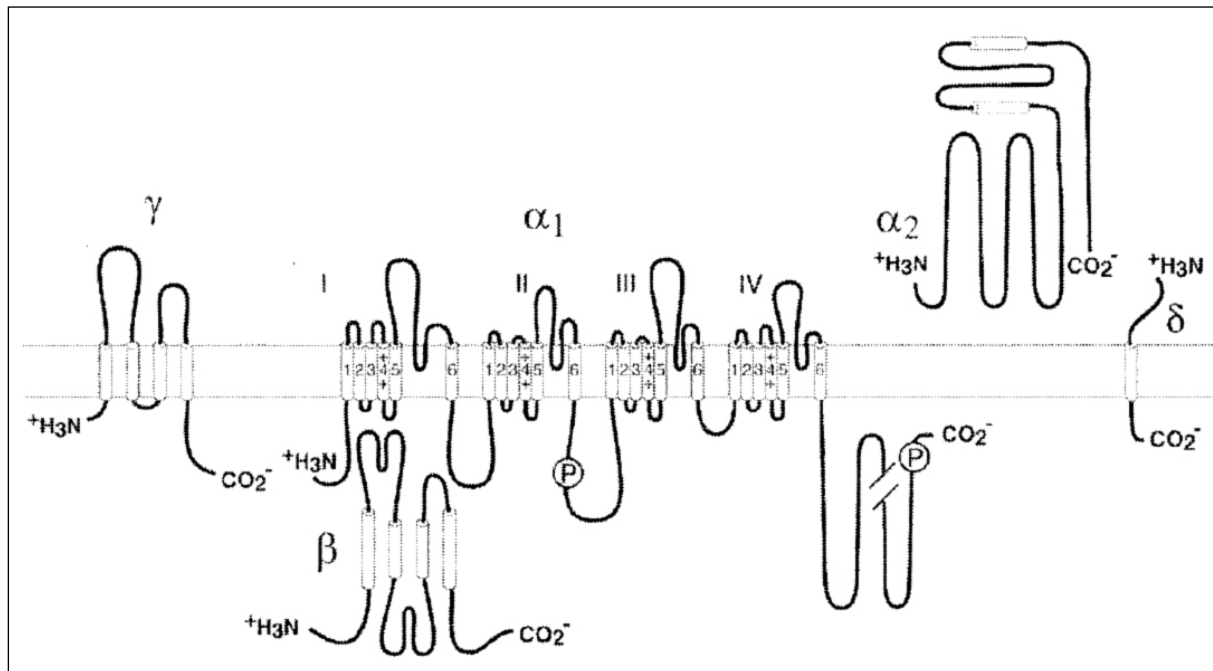


Abb. 1.2.2 Das Schema eines Vertebraten-Calcium-Kanals

Dargestellt sind die fünf Untereinheiten, die den kompletten Kanal in einer Synapse bilden. Die α_1 -Untereinheit ist für die Formierung der eigentlichen Pore verantwortlich. Die mit dieser Hauptuntereinheit assoziierten Untereinheiten sind für die Steuerung des Kanals verantwortlich. Zu sehen sind die β - (unten), α_2 - (oben rechts), δ - (oben rechts) und γ - (links) Untereinheiten (Catterall WA., 2000 und 2003). Der untere Teil der Abbildung entspricht dem zytoplasmatischen Teil der Synapse, der obere dem synaptischen Spalt.

2005; Catterall WA. *et al.*, 2003). Calcium-Kanäle sind in Vertebraten intensiv biochemisch untersucht worden. Dennoch ist über die molekulare Steuerung noch wenig bekannt. Die Kanäle bestehen aus vier oder fünf verschiedenen Untereinheiten, die von mehreren Genen codiert werden (Catterall WA. *et al.*, 2000). Diese Proteine werden als α_1 -, β -, α_2 -, δ - und γ -Untereinheiten bezeichnet (Abb. 1.2.2). Die α_2 -Untereinheit bildet zusammen mit δ eine Einheit. Calcium-Kanäle sind weitestgehend durch ihre physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften charakterisiert. Diese wiederum beruhen auf unterschiedlichen α_1 -Untereinheiten. So wurde zum Beispiel als erstes der Dihydropyridin-empfindliche Calcium-Kanal aus Muskeln gereinigt und biochemisch analysiert (Curtis BM. & Catterall WA., 1984; Catterall WA., 1988). Man unterscheidet in Vertebraten L-, N-, P-, Q-, T- und R-Subtypen von Kanälen, die auch von $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$, $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ bis $Ca_v3.3$ bezeichnet werden (Catterall WA. *et al.*, 2000).

Auch in *Drosophila* wurden verschiedene Subtypen von Calcium-Kanälen gefunden. Es gibt vier Gene, codierend für unterschiedliche α_1 -Untereinheiten, unter denen sich auch T-typ/ α_1G -, L-typ/ α_1D -(*Dmca1D*), N-typ/ α_1A -(*Dmca1A*) Kanäle und ein Homolog von zwei *C. elegans*-Calcium-Kanälen befinden (Gielow ML. *et al.*, 1995; Littleton JT. & Ganetzky B., 2000). Ein besser charakterisiertes Gen einer α_1 -Untereinheiten ist *cacophony* (*Dmca1A*), dessen temperatursensitive Mutante Verhaltensphänotypen verursacht und durch eine verminderte Reizweiterleitung charakterisiert ist (Kawasaki F. *et al.* 2002 und 2004; Brooks IM. *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde entdeckt, dass *Drosophila* L-typ Calcium-Kanäle den epithelialen Flüssigkeitstransport in malphigischen Gefäßen regulieren (MacPherson MR. *et al.*, 2001). Vor kurzem wurde eine $\alpha_2\delta$ -Untereinheit beschrieben (Dickman DK. *et al.*, 2008). Auffallend ist, dass bei *Drosophila* noch keine γ -Untereinheiten bekannt sind (Littleton JT. & Ganetzky B., 2000). Ich möchte nun diese Gruppe genauer vorstellen, da deren Charakterisierung für das tiefere Verständnis der Modulation von Calcium-Kanälen ausschlaggebend ist und Hinweise für die Entstehung von neuronalen Krankheiten beim Menschen liefern könnte (Steinlein OK. & Noebels JL., 2000).

1.2.3 Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten

Es gibt in Vertebraten Transmembranproteine, die eine Sequenzähnlichkeit mit der PMP-22/EMP/MP20/Claudin-Familie zeigen (Van Itallie CM. & Anderson JM., 2004; Black JL III., 2003), aber eine ganz andere Funktion ausüben. Diese Proteine besitzen ebenfalls, *in silico* Vorhersagen zufolge, vier Transmembrandomänen, drei zytoplasmatische Domänen und zwei extrazelluläre Domänen. Es handelt sich um Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten, die spezifisch an Synapsen lokalisiert sein können, aber auch in anderen Geweben vorkommen (Black JL III., 2003). Es wurden beim Menschen bisher acht codierende Gene (γ_1 - γ_8) beschrieben, deren Proteine

untereinander Sequenzhomologie aufweisen (Burgess DL. *et al.*, 2001). Es wird kontrovers diskutiert, ob wirklich alle mit präsynaptischen Calcium-Kanälen interagieren, eher postsynaptische AMPA-Rezeptoren regulieren oder beides erfüllen (Fukaya M. *et al.*, 2005; Black JL III., 2003). Gamma Untereinheiten sind also möglicherweise direkt mit der α_1 -Untereinheit assoziiert und wirken dort inhibitorisch auf den Kanal ein (Varadi G. *et al.*, 1995; Hansen JP. *et al.*, 2004). Die Mutante einer putativen Calcium-Kanal Gamma Untereinheit, *stargazer*, weist so zum Beispiel im Mausmodell einen Phänotyp in Form von *absence*-Epilepsie auf (Letts VA. *et al.*, 1998). Allerdings ist diese Proteinfamilie der Calcium-Kanal-Modulatoren wenig analysiert. Möglicherweise hilft an dieser Stelle der Modellorganismus *Drosophila*, um mehr Einsicht in die molekularen Eigenschaften dieser Ionenkanäle und ihren Untereinheiten zu erlangen.

1.2.4 Erste Analysen des Gens *hot dog*

Megatrachea war das erste Protein, das in *Drosophila* als echtes Claudin der PMP-22/EMP/MP20/Claudin-Familie zugeordnet werden konnte (siehe Kapitel 1.1.4). Durch *in silico* Sequenzanalysen wurden in *Drosophila* noch weitere Vertreter dieser Familie gefunden (Behr M. *et al.*, 2003; Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Während meiner Diplomarbeit 2005 untersuchte ich die Expression des claudinähnlichen *Drosophila*-Gens *hot dog* (*hot*, CG6398). Das Genprodukt besitzt *in silico* Sequenzanalysen zufolge vier Transmembrandomänen, drei intrazelluläre Domänen und zwei extrazelluläre Domänen. Es ist mit 290AS (32,9kDa) das längste der Claudinähnlichen in *Drosophila*. Zunächst betrachtete ich die embryonale Genexpression mittels mRNA *whole mount in situ* Hybridisierung. Es zeigte sich zu *mega* ein weitestgehend identisches Expressionsmuster. *hot* ist in ektodermal abgeleiteten Epithelien wie der Epidermis, dem Tracheensystem, Vorder- und Hinterdarm, entlang der ventralen Mittellinie des Nervensystems sowie in den Speicheldrüsen exprimiert. Es kommt auch zu einer apikalen Anreicherung der

mRNA in diesen Zellen. Die Überexpression eines Hot-GFP- (GFP=*green fluorescent protein*; Tsien RY., 1998) Fusionsproteins zeigte in den betroffenen, epithelialen Geweben eine apikale Konzentration neben einer basolateralen Verteilung.

Um Hinweise auf die Funktion von Hot zu erlangen, wurden mittels unpräziser P-Element-Remobilisierung (Adams MD. & Sekelsky JJ., 2002) Mutanten erzeugt. Bei *hot*⁹ ist ein Teil des ersten Exons und damit das erste Startcodon deletiert, aber noch ein Transkript nachweisbar. Daher besteht auch die Möglichkeit, dass ein verkürztes Hot-Protein von einem zweiten ATG aus synthetisiert wird. *hot*¹² ist eine Mutante in der das komplette erste Exon deletiert wurde. Offenbar fehlt auch ein Teil der Regulationsregion, da mittels *whole mount in situ* Hybridisierung keine mRNA mehr nachweisbar ist. Die Mutanten wurden durch PCR und DNA-Sequenzierung verifiziert. In den lebensfähigen *hot*¹² Mutanten konnte im embryonalen Tracheensystem ein schwacher Phänotyp gefunden werden, der sich durch einen an den Metameren leicht eingeschnürten, dorsalen Hauptstamm (*dorsal trunk*, vergleiche Abb. 1.1.3) äußert. Diese wurstartige Struktur verleitete mich, diesem Gen den Namen *hot dog* zu geben. Ähnlich wie bei *mega*-Mutanten (Behr M. *et al.*, 2003) ist bei *hot*¹² die epitheliale Polarität nicht gestört. Polaritätsmarker wie Coracle (Fehon RG. *et al.*, 1994), Armadillo (Oda H. *et al.*, 1993) und Crumbs (Tepass U. *et al.*, 1990) sind in ektodermalen Geweben nicht misslokalisiert. Zellverbindungen sind in ihrem Aufbau nicht gestört. Weitere embryonale Phänotypen konnten nicht gefunden werden. In dieser Arbeit lege ich Ergebnisse vor, die für das Protein Hot Dog eine Funktion in Neuronen zusprechen und weitere Einblicke in die Funktionsweise von Calcium-Kanälen bieten könnten.

2 Ergebnisse

2.1 Das TEV-Protease-System in *Drosophila melanogaster*

Das für die *barrier function* von *Drosophila*-Epithelien essenzielle Transmembranprotein Megatrachea (Mega; Behr M. *et al.*, 2003) konnte in der Vergangenheit mit bisher etablierten Methoden nicht detailliert untersucht werden. Es zeigte sich, dass eine Deletion des Mega-C-Terminus zu einem fehlerhaften Transport des Proteins an die Zellmembran führt und dadurch Letalität erzeugt wird (Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Deshalb war es mein Ziel, eine neue Methode zu entwickeln, um Proteine posttranslational *in vivo* untersuchen zu können. Hierzu verwendete ich die TEV-NIa-Protease und testete deren Wirksamkeit in *Drosophila*-

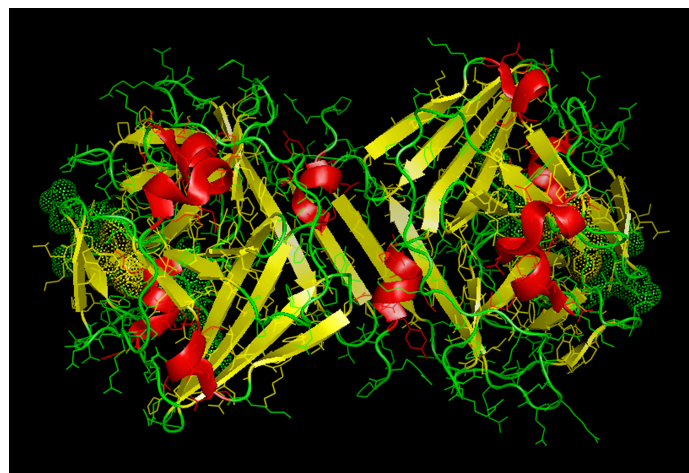


Abb. 2.1 Die TEV-Protease in Komplex mit dem Substrat

Zu sehen ist die Kristallstruktur der TEV-Protease mit ihrem Substrat (nach Phan J. *et al.*, 2002). Die Abbildung wurde mit MacPyMol erzeugt.

Zellkultur mit KC₁₆₇-Zellen (Bourois M. & Jarry B., 1983) und *Drosophila*-Geweben. Das *tobacco-etch-virus* (TEV) ist ein Mitglied der Familie der Kartoffel-Virus-Y Gruppe und gehört zu den *Potyviridae* (Gruppe IV Pflanzen- (+) ssRNA-Viren; Dougherty WG., 1983; Allison RF. *et al.*, 1985). Es wird ein 346kDa großes Polyprotein translatiert, dass nachfolgend in zwei funktionale Proteasen (87kDa und 49kDa) prozessiert wird (Dougherty WG. *et al.*, 1989). Kürzt man die 49kDa große Protease um die 202AS des N-terminalen Bereiches, kommt es zu keinem Funktionsverlust (Carrington JC. & Dougherty WG., 1987a/b). Die in dieser Arbeit verwendete TEV-Protease ist das *Nuclear Inclusion a-* (NIa-) Protein mit einer Größe von 27kDa. Dieses Enzym wird seit längerem bei biochemischen Verfahren als Werkzeug eingesetzt, um

Epitopmarkierungen während Proteinaufreinigungen zu entfernen. Die TEV-Protease schneidet mit der höchsten Effizienz die Aminosäuresequenz ENLYFQ*S/G. Der proteolytische Schnitt erfolgt zwischen Q und S (oder G). Die Konsensussequenz ist EXXYXQ*S/G, was einen gewissen Spielraum in der Substratsequenz gewährt, aber dennoch hohe Spezifität der TEV-Protease garantiert (Carrington JC. & Dougherty WG., 1988; Dougherty WG. *et al.*, 1989; Kapust RB. *et al.*, 2002). Ein weiterer Vorteil ist die Eigenschaft, dass das Enzym bei 4°C nur dreimal weniger aktiv ist als bei 20°C (Nallamsetty S. *et al.*, 2004). Somit ergibt sich bezüglich der Temperatur ein großer Wirkungsbereich.

Diese Protease bildete die Grundlage meiner Untersuchungen zur Entwicklung einer neuen Methode in *Drosophila*. Ich stelle in der vorliegenden Arbeit diese Methode vor, die es zum Ziel hat, Proteine posttranslational *in vivo* direkt zu manipulieren.

2.1.1 Die Fragmentierung eines dTao-Fusionsproteins in KC₁₆₇-Zellen durch die TEV-Protease

Das *Drosophila*-dTao-Protein (codiert von *dtao*, CG14217) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die der STE20-Familie angehört und in höheren Vielzellern (*Eumetazoa*) konserviert ist (Dan I. *et al.*, 2001). Diese Kinasen regulieren fundamentale zelluläre Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose und Stressantwort (Dan I. *et al.*, 2001). dTao besitzt neben einer Kinasedomäne eine Zytoplasmalokalisationsdomäne und ist normalerweise im Zytosol lokalisiert (Strange K. *et al.*, 2005; Pflanz R., unpublizierte Ergebnisse). Dies machte ich mir zur Analyse der TEV-Protease-Aktivität zu Nutze. Ich fügte vor die Lokalisationsdomäne eine TEV-Protease-Schnittstelle (TEV-protease cleavage site, Kurzform: TEVpcs) und ein Fluorophor (*yellow fluorescent protein*, YFP; Nagai T. *et al.*, 2002) in der Weise ein, dass die Kinasedomäne zusammen mit YFP

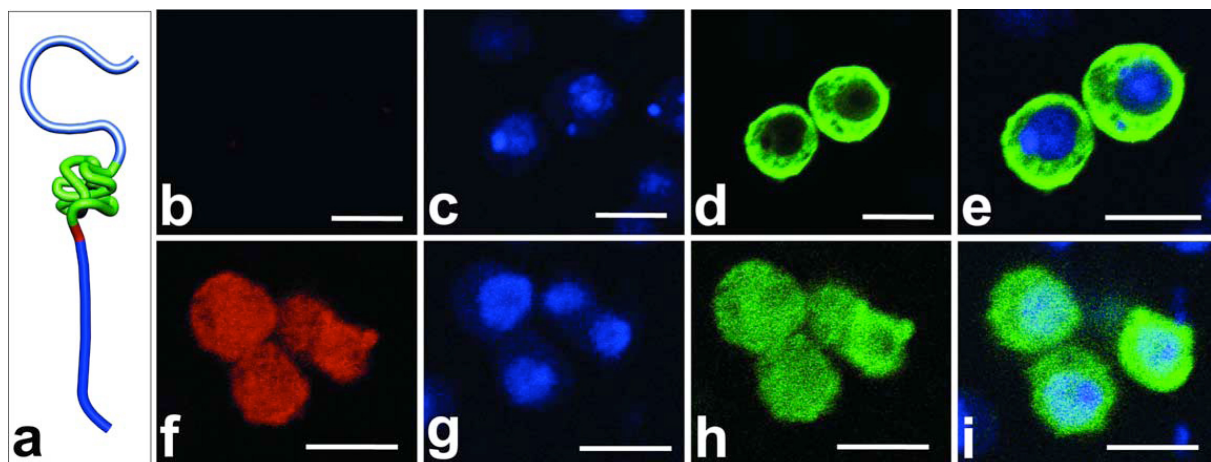


Abb. 2.1.1 TEV-Protease-vermitteltes Fragmentieren eines dTao-Fusionsproteins in *Drosophila*-Zellkultur

In (a) ist ein Schema des dTao-Fusionsproteins dargestellt. Dunkelblau erscheint die Zytoplasmalokalisationsdomäne. In rot ist die TEV-Schnittstelle markiert. Die Kinasedomäne (N-Terminus) ist in hellblau mit YFP (*yellow fluorescent protein*, grün) abgebildet. KC₁₆₇-Zellen mit pAct5C-GAL4, pUAST-dTao-NTerm-YFP-TEVpcs-dTaoCTerm (b-e) oder pAct5C-GAL4, pUAST-dTao-NTerm-YFP-TEVpcs-dTaoCTerm und pUAST-myc-TEV (f-i) wurden mit anti-myc-Antikörper gegen myc-TEV (roter Kanal, b und f), mit DRAQ5 gegen DNA (blauer Kanal, c und g) und mit anti-GFP-Antikörper gegen dTao-Kinasedomäne-YFP (grüner Kanal, d und h) gefärbt. (e) und (i) sind die Überlagerungen der blauen und grünen Kanäle. YFP und DNA zeigen keine Kolokalisierung in Zellen, die keine TEV-Protease exprimieren (b-e). Im Gegensatz dazu führt die TEV-Protease-Expression zu einer Kolokalisierung von YFP und DNA (f-i). Dies ist ein Indiz für die Fragmentierung des dTao-Fusionsproteins durch die TEV-Protease. Die TEV-Protease-Verteilung ist nicht nur auf das Zytoplasma beschränkt, sondern auch im Zellkern zu erkennen. Beachte: der anti-GFP-Antikörper detektiert auch die GFP-Variante YFP. Die weißen Balken entsprechen 5μm.

TEV-Protease-vermittelt abgespalten werden kann (dTao-NTerm-YFP-TEVpcs-dTaoCTerm, Kurzform: dTao-TEVpcs). Ich ließ nachfolgend KC₁₆₇-Zellen dTao-TEVpcs alleine oder zusammen mit der TEV-Protease (myc-TEV) exprimieren. Die Zellen wurden hierfür transfiziert, bei 25°C inkubiert, anschließend fixiert und angefärbt (siehe Material und Methoden. Beachte: der anti-GFP-Antikörper detektiert auch die GFP-Variante YFP). In Abb. 2.1.1 sind die Ergebnisse des Experiments dargestellt. Zur Verdeutlichung des Aufbaus des dTao-Fusionsproteins ist in (Abb. 2.1.1 a) ein Schema abgebildet. Bei Zellen, die nur das Fusionsprotein exprimieren, aber nicht die TEV-Protease (Abb. 2.1.1 b-e), zeigte sich das YFP-Signal (grün in Abb. 2.1.1 d und e) mit zytoplasmatischer Lokalisierung und nicht im Zellkern (Abb. 2.1.1 e). Dies weist darauf hin, dass das Fusionsprotein aufgrund der assoziierten Lokalisationsdomäne ausschließlich im Zytoplasma zu finden ist. Nach Koexpression von dTao-TEVpcs mit myc-TEV (Abb. 2.1.1 f-i) konnte das YFP-Signal im Zytoplasma, als auch ektopisch im Zellkern detektiert werden (Abb. 2.1.1 h und i). Dieser Sachverhalt zeigte mir, dass die TEV-Protease erfolgreich das Fusionsprotein spaltete und der N-Terminus zusammen mit YFP in den Nukleus diffundieren konnte. Dabei waren die Zellen lebens- und teilungsfähig (nicht gezeigt). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die TEV-Protease (myc-TEV) nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Nukleus zu finden war (Abb. 2.1.1 f). Offenbar diffundierte diese passiv in den Zellkern, da kein bekanntes Kernlokalisierungssignal für einen aktiven Transport vorhanden war. Diese ersten Ergebnisse zeigten mir eine Aktivität der TEV-Protease in *Drosophila*-Zellen. Dies ermunterte mich, die Effizienz des Enzyms durch weiterführende Experimente genauer zu untersuchen.

2.1.2 Die zeitabhängige Fragmentierung eines CD8-Fusionsproteins in KC₁₆₇-Zellen durch die TEV-Protease

Nachdem ich festgestellt hatte, dass die TEV-Protease *in vivo* in Zellkultur proteolytisch das dTao-Fusionsprotein schneidet, interessierte ich mich für die Effizienz mit der dieser Prozess geschieht. Hierfür konstruierte ich ein erweitertes CD8-Gen (CD8-EGFP-TEVpcs-NLS-mCherry, Kurzform: CD8-EGFP-TEVpcs), dass aus mehreren Bestandteilen aufgebaut ist. Das Genprodukt (Abb. 2.1.2 a) besteht aus einem CD8-Membrananker (Devine L. *et al.*, 1999) der mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*; Tsien RY., 1998) fusioniert ist. Weiter C-terminal befindet sich eine TEV-Protease-Schnittstelle, gefolgt von einer dreifachen Kernlokalisationssequenz

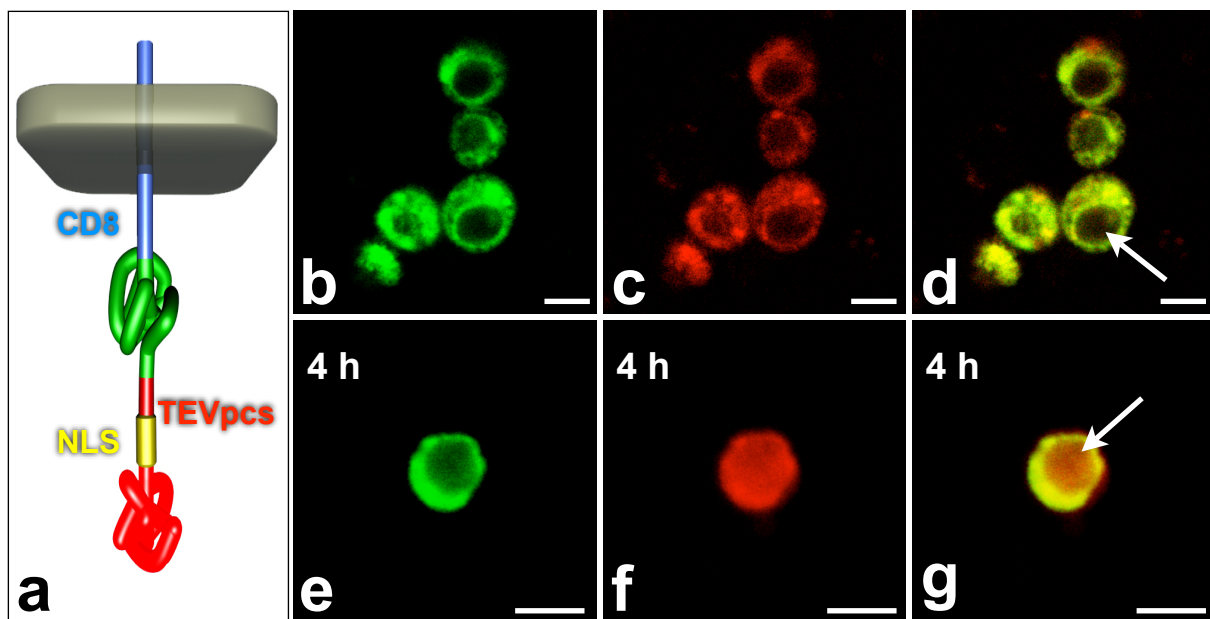


Abb. 2.1.2 TEV-Protease-vermitteltes Fragmentieren eines CD8-Fusionsproteins in *Drosophila*-Zellkultur

Das Schema (a) verdeutlicht den Aufbau des erweiterten CD8-EGFP-TEVpcs-NLS-mCherry-Proteins. Dieses besteht aus einem Membrananker (CD8, blau), einen grünen Fluorophor (*enhanced green fluorescent protein*, EGFP, grün), einer TEV-Protease-Schnittstelle (TEVpcs, dunkles Rot), einer Kernlokalisationssequenz (NLS, gelb) und einem roten Fluorophor (mCherry, helles Rot). Die Zellmembran ist in ocker dargestellt. Der untere Teil entspricht der zytoplasmatischen Region. Mit pUbiP-CD8-EGFP-TEVpcs-NLS-mCherry und pMT/V5-HisA-TEV transfizierte lebende KC₁₆₇-Zellen ohne Induktion der TEV-Protease (b-d). Zu erkennen ist das grüne EGFP (b) und das rote mCherry (c), die nach Überlagerung im Zytoplasma und vermutlich an der Membran kolokalisiert erscheinen (d), aber nicht im Nukleus zu finden sind (Pfeil in d). Mit pUbiP-CD8-EGFP-TEVpcs-NLS-mCherry und pMT/V5-HisA-TEV transfizierte lebende KC₁₆₇-Zellen 4h nach Induktion der TEV-Protease (e-g). Man kann gegenüber dem EGFP (e) eine Anreicherung des NLS-mCherry (f) im Nukleus in erkennen (Pfeil in g). Dies zeigt eine deutliche Aktivität der TEV-Protease. Die weißen Balken entsprechen 5µm.

(NLS) und einem RFP (*red fluorescent protein*) namens mCherry (Shaner NC. *et al.*, 2005). Wenn das Fusionsprotein in einer lebenden Zelle durch die TEV-Protease geschnitten wird, erwarte ich einen aktiven Transport von NLS-mCherry in den Nukleus, während das CD8-EGFP außerhalb verbleibt. Zunächst ließ ich *Drosophila*-KC₁₆₇-Zellen CD8-EGFP-TEVpcs exprimieren (siehe Material und Methoden). Nach einem Tag Inkubation bei 25°C induzierte ich die TEV-Protease-Expression durch Zugabe von 500µM CuSO₄ in das Zellkulturmedium und beobachtete die Verteilung der Fluorophore in lebenden Zellen nach vier Stunden unter einem Leica TCS SP2 Mikroskop (Abb. 2.1.2 b-g). Bei nicht induzierten Zellen ist das Signal der beiden Fluorophore, offenbar durch eine sehr hohe Expressionsstärke, gemeinsam im Zytoplasma überlagert und wahrscheinlich auch in der Membran zu erkennen (Abb. 2.1.2 d). Das Fusionsprotein ist nicht im Zellkern zu beobachten (Pfeil in Abb. 2.1.2 d). Wurde die Expression der TEV-Protease induziert, kam es nach vier Stunden zu einer Anreicherung von NLS-mCherry im Zellkern (Pfeil in Abb. 2.1.2 g). Das offenbart eine deutliche Aktivität der TEV-Protease.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die TEV-Protease in kultivierten *Drosophila*-Zellen innerhalb weniger Stunden ein Zielprotein prozessieren kann. Ausgehend davon interessierte ich mich für die Anwendbarkeit der TEV-Protease in *Drosophila*-Fliegen. Hierfür testete ich zuerst die Lebensfähigkeit der Fliegen nach TEV-Protease-Expression.

2.1.3 TEV-Protease-Expression und die Interferenz mit der Entwicklung von *Drosophila*

Nach den Ergebnissen, die zeigen, dass die TEV-Protease in *Drosophila*-Zellkultur aktiv ist (2.1.1 und 2.1.2), stellte sich die Frage, ob sich eine Expression der TEV-Protease toxisch auf Fliegen auswirkt. Dies würde eine strenge Limitierung für die *in vivo* Anwendbarkeit der TEV-Protease bei Studien von Proteinen bedeuten. Um dies zu analysieren führte ich verschiedene Fliegenkreuzungen durch. Hierbei

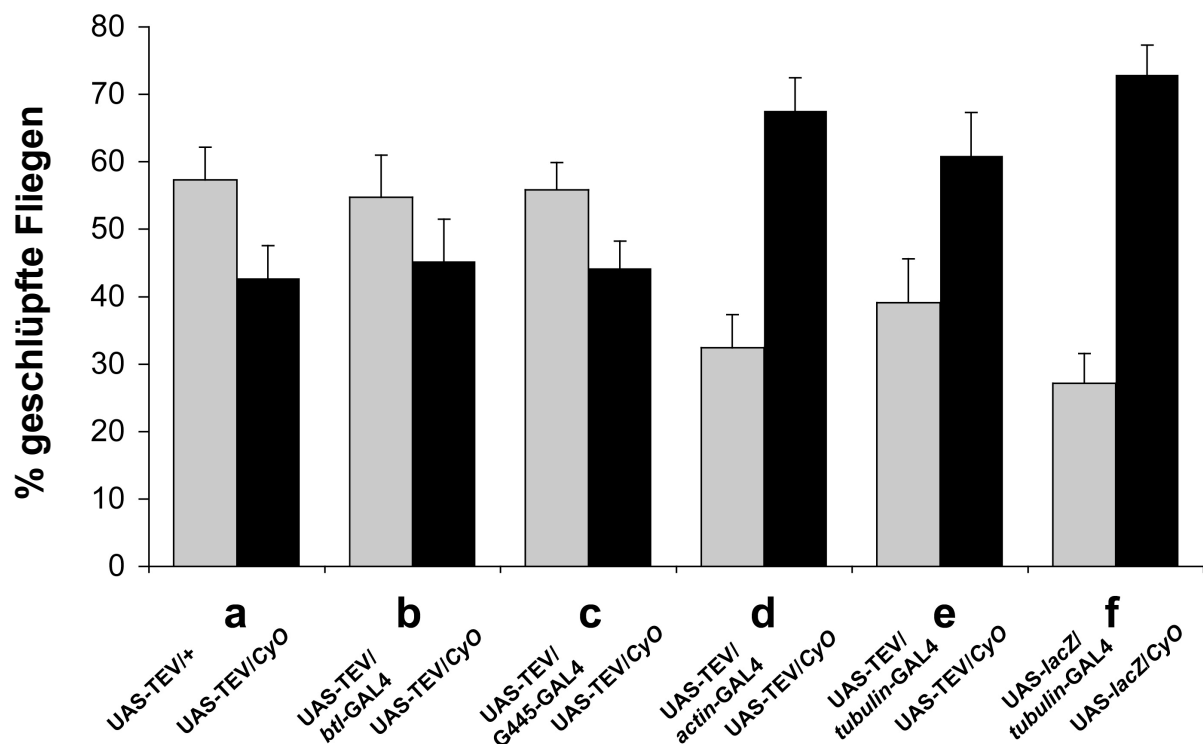


Abb. 2.1.3 Geschlüpfte Fliegen nach Expression der TEV-Protease in verschiedenen Geweben

Weibliche Fliegen, die homozygot für UAS-TEV (a-e) oder UAS-lacZ (f) auf dem zweiten Chromosom waren, wurden mit Männchen mit folgenden Genotypen gekreuzt: +/CyO (a), *btl*-GAL4/CyO (b), G445-GAL4/CyO (c), *actin*-GAL4/CyO (d) und *tubulin*-GAL4/CyO (e und f). Für jede Kreuzung wurden drei Fliegenröhrchen angesetzt und bei 25°C inkubiert. Die Cy⁺ (graue Balken) und Cy⁻ Fliegen (schwarze Balken) wurden gezählt und entsprechen zusammen 100% der geschlüpfen Fliegen des jeweiligen Gefäßes. Es wurden pro Röhrchen 300-400 Fliegen ausgewertet. Zu erkennen ist, dass die *balancer*-Fliegen gegenüber UAS-TEV/Cy⁺-Fliegen weniger vital sind (a). Die ektodermale Überexpression der TEV-Protease mit *btl*-GAL4 und G445-GAL4 führte nur zu einer leichten Reduktion der Vitalität gegenüber den *balancer*-Fliegen (b und c). Überexprimierten jedoch alle Gewebe die TEV-Protease (d und e) zeigte sich eine stärkere Reduktion der Lebensfähigkeit gegenüber den *balancer*-Fliegen. Allerdings war dies auch bei der Überexpression von LacZ zu beobachten (f). Dies zeigt, dass es keine oder nur vernachlässigbare Effekte, durch die proteolytische Aktivität der TEV-Protease, auf die Lebensfähigkeit der Fliegen gibt. Auch gilt es zu beachten, dass *actin*-GAL4 und *tubulin*-GAL4 homozygot letale Fliegenlinien sind. Zusammenfassend betrachtet wurden nach selektiver oder ubiquitärer TEV-Protease-Expression lebensfähige und fertile Fliegen beobachtet.

überexprimierte ich die TEV-Protease in verschiedenen Geweben und wertete die Genotypen der schlüpfenden Fliegen aus. Ich verwendete *Curly* (*Cy*) als einen Marker, der sich durch gekrümmte Flügel bei den Fliegen bemerkbar macht. Schlüpfende Fliegen die immer genotypisch als UAS-TEV/*CyO* (keine Expression der TEV-Protease) auftreten, sollten jedes Mal die gleiche Vitalität zeigen und dienten als Kontrolle. Abb. 2.1.3 zeigt die Ergebnisse. Die grauen und schwarzen Balken ergeben zusammen 100% der gezählten Fliegen und repräsentieren die beobachteten Verhältnisse. Zunächst stellte ich fest, dass *Cy*⁻-Fliegen gegenüber UAS-TEV/*Cy*⁺-Fliegen eine verminderte Lebensfähigkeit besitzen (Abb. 2.1.3 a). Möglicherweise sind die vielen genomischen Inversionen des *balancers* *CyO* und die dominante Mutation von *Cy* gegenüber wildtypischen Chromosomen dafür verantwortlich. Nach einer gewebespezifischen Überexpression der TEV-Protease in verschiedenen ektodermal abgeleiteten Geweben (Abb. 2.1.3 b und c) zeigte sich gegenüber den nicht TEV-Protease exprimierenden Fliegen (Abb. 2.1.3 a) eine nur sehr leichte Reduktion in der Vitalität. Kam es *actin*-GAL4- (Abb. 2.1.3 d) oder *tubulin*-GAL4- (Abb. 2.1.3 e) vermittelt zu einer ubiquitären Überexpression der TEV-Protease, konnte eine stärkere Reduktion der Vitalität beobachtet werden. Die ebenfalls verminderte Lebensfähigkeit nach ubiquitärer Überexpression der *E. coli* β -Galactosidase (LacZ) zeigte jedoch, dass dies wahrscheinlich nicht auf die proteolytische Aktivität der TEV-Protease zurückzuführen ist (Abb. 2.1.3 f). Die Reduktion der Lebensfähigkeit durch die Überexpression von β -Galactosidase oder TEV-Protease wird möglicherweise in beiden Fällen allein durch die unphysiologisch hohe Proteinexpression hervorgerufen. Ich konnte somit feststellen, dass nach Expression der TEV-Protease lebensfähige und fertile Fliegen schlüpften, und die Anwendung des Enzyms zur Manipulation von Zielproteinen *in vivo* geeignet ist.

2.1.4 Die Fragmentierung eines dTao-Fusionsproteins in trachealen Plakoden durch die TEV-Protease

Die erfolgreiche Spaltung von dTao-TEVpcs (siehe 2.1.1) und CD8-EGFP-TEVpcs (siehe 2.1.2) im Zellkultursystem mithilfe der TEV-Protease zeigte, dass es möglich ist in lebenden Zellen Zielproteine zu manipulieren. Ich interessierte mich nun dafür, ob dies auch für komplexe multizelluläre Systeme zutrifft und generierte transgene Fliegenlinien mit dTao-TEVpcs (siehe Material und Methoden). Ich exprimierte dTao-TEVpcs, und die TEV-Protease sowie als Kontrolle dTao-TEVpcs alleine im Tracheensystem (*btl*-GAL4-vermittelt, mit freundlicher Unterstützung von R. Pflanz). In Abb. 2.1.4 wird deutlich, dass das Zielprotein in den trachealen Plakoden von Stadium 13 Embryonen erfolgreich exprimiert wurde. Hier ist ebenso wie im Zellkultursystem eine zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins (Pfeil in Abb. 2.1.4 a), verursacht durch die Zytoplasmalokalisationsdomäne, zu erkennen. Im Zellkern war das Fusionsprotein nicht detektierbar (Sternchen in Abb. 2.1.4 a). Die Koexpression der TEV-Protease mit dem Fusionsprotein in Tracheenzellen führte zu

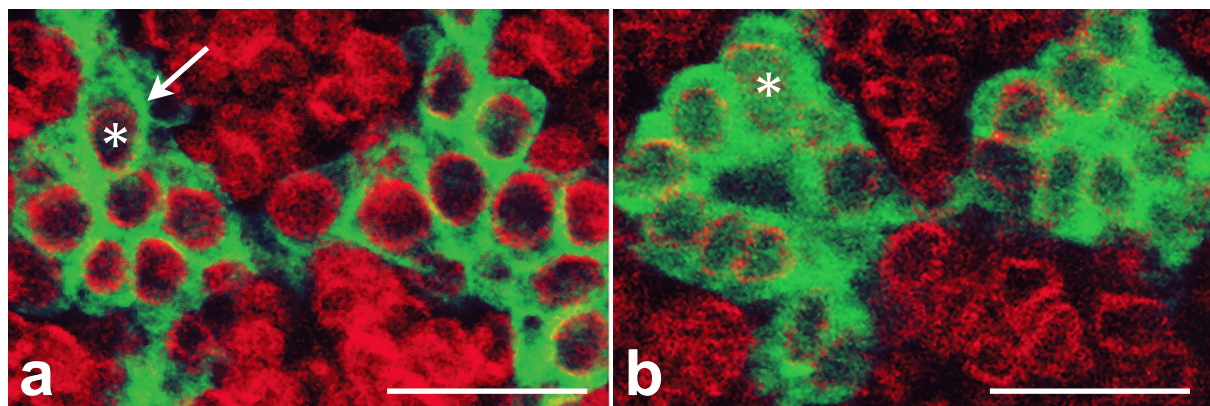


Abb. 2.1.4 TEV-Protease-vermitteltes Fragmentieren eines dTao-Fusionsproteins in *Drosophila*-Embryonen

Die Abbildung zeigt eine anti-GFP- (grün) und anti-Lamin- (rot) Antikörperfärbung an Stadium 13 Embryonen. Diese tragen die Transgene UAS-dTao-NTerm-YFP-TEVpcs-dTaoCTerm (dTao-TEVpcs) und *btl*-GAL4 (a) sowie UAS-dTao-NTerm-YFP-TEVpcs-dTaoCTerm (dTao-TEVpcs), UAS-TEV und *btl*-GAL4 (b). In den trachealen Plakoden ist in Abwesenheit von der TEV-Protease das dTao-TEVpcs-Fusionsprotein (siehe Abb. 2.1.1 a) im Zytoplasma (Pfeil in a) konzentriert, aber vom Zellkern ausgeschlossen (Sternchen in a). Dagegen ist das YFP-Signal ectopisch nach TEV-Protease-Expression im Zellkern misslokalisiert (Sternchen in b). Dies ist ein Hinweis auf die erfolgreiche Spaltung des Fusionsproteins mittels der TEV-Protease. Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 10µm.

einer Anreicherung des YFP-Signals im Zellkern (Sternchen in Abb. 2.1.4 b). Dieser Sachverhalt deckt sich mit den Ergebnissen aus 2.1.1 und deutet auf die proteolytische Spaltung des dTao-Fusionsproteins in *Drosophila*-Embryonen. Die bisher gezeigten Versuche erzeugten trotz ektopischer Expression von dTao und TEV keine erkennbaren Phänotypen. Es wurde somit deutlich, dass sich die TEV-Protease auch in mehrzelligen Geweben nutzen lässt, um Proteine posttranslational zu verändern.

2.1.5 Die Fragmentierung eines Mega-Fusionsproteins in *Drosophila*-Embryonen durch die TEV-Protease

Die bisherigen Analysen einer möglichen Anwendung der TEV-Protease bei *Drosophila* stützen sich auf ektopisch überexprimierte Zielproteine (dTao-TEVpcs und CD8-EGFP-TEVpcs siehe 2.1.1, 2.1.2 und 2.1.4). Um die TEV-Protease-vermittelte Prozessierung *in vivo* unter wildtypähnlichen Bedingungen zu erforschen, wurden transgene Fliegenlinien erzeugt, die das Zielprotein Megatrachea (Mega) unter der Kontrolle der endogenen regulatorischen *mega*-DNA-Region exprimieren (*mega rescue*). *mega* mutante Fliegenlinien, die *mega rescue* besitzen, sind lebensfähig und weisen eine wildtypische Lokalisation des Mega-Proteins in den *septate junctions* (SJs) auf.

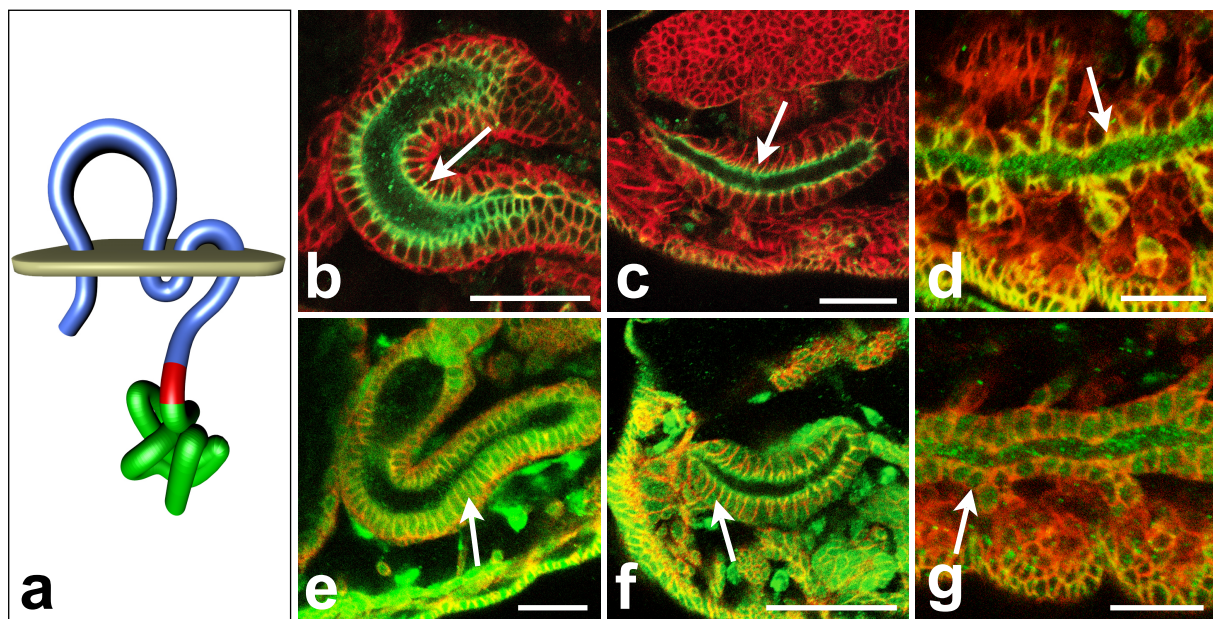


Abb. 2.1.5 TEV-Protease-vermitteltes Fragmentieren eines Mega-Fusionsproteins in *Drosophila*-Embryonen

Das Schema (a) stellt das Mega-TEVpcs-YFP-Fusionsprotein dar. Mega ist in blau, TEVpcs in rot, YFP in grün und die Zellmembran in ocker abgebildet. Der untere Teil entspricht der zytoplasmatischen Region. (b-g) Anti-GFP- (grün) und anti-Spectrin- (rot) Antikörperfärbungen an Stadium 16 *Drosophila*-Embryonen des Hinterdarms (b und e), der Speicheldrüse (c und f) und des Tracheensystems (d und g). In (b-d) sind Embryonen abgebildet, die nur das Mega-TEVpcs-YFP *rescue* Konstrukt tragen. In (e und f) sind Embryonen zu sehen, die neben dem Mega-TEVpcs-YFP *rescue* Konstrukt auch zusammen G45-GAL4 und UAS-TEV tragen. In (g) tragen die Embryonen neben Mega-TEVpcs-YFP *rescue*, *btl*-GAL4 und UAS-TEV. Die zelluläre, apikolaterale Lokalisation des Mega-Fusionsproteins wird mit dem Zellmembranmarker Spectrin im Hinterdarm (Pfeil in b), in der Speicheldrüse (Pfeil in c) und im Tracheensystem (Pfeil in d) deutlich. Nach TEV-Protease-Expression in ektodermal abgeleiteten Geweben mit G45-GAL4 oder *btl*-GAL4 kommt es zu einer ubiquitären Verteilung des YFP in den betroffenen Zellen des Hinterdarms (Pfeil in e), der Speicheldrüse (Pfeil in f) und des Tracheensystems (Pfeil in g). Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 30 μm.

auf (nicht gezeigt). Ich habe nachfolgend ein *mega rescue* Konstrukt erzeugt, das für ein Mega-Fusionsprotein codiert, bei dem am C-Terminus YFP über eine TEVpcs fusioniert ist (Mega-TEVpcs-YFP *rescue*). Nachdem ich transgene Fliegenlinien etabliert hatte, zeigte sich, dass diese lebensfähig sowie fertil sind und sie eine wildtypische apikolaterale Lokalisierung des Mega-Fusionsproteins (Abb. 2.1.5 a) in den SJs des Hinterdarms, der Speicheldrüse und des Tracheensystems aufweisen (Pfeil in Abb. 2.1.5 b, c und d). In diesen Fliegenlinien exprimierte ich mithilfe des GAL4/UAS-Systems (Brand AH. & Perrimon N., 1993; Duffy JB., 2002) durch *btl*-GAL4 und G445-GAL4 die TEV-Protease in verschiedenen ektodermal abgeleiteten Geweben. Diese zeigten das YFP-Signal nicht mehr in den SJs, sondern offenbarten vielmehr eine ubiquitäre Verteilung des YFP innerhalb der Zellen des Hinterdarms (Pfeil in Abb. 2.1.5 e), der Speicheldrüse (Pfeil in Abb. 2.1.5 f) und des Tracheensystems (Pfeil in Abb. 2.1.5 g). Das ist ein Zeichen dafür, dass YFP mit einer hohen Effizienz von Mega abgeschnitten wurde. Somit zeigt sich, dass mit dieser Methode Proteine in bestimmten Zellen selektiv auf ihre Funktion untersucht werden können. Darüber hinaus wird an dieser Stelle noch ein weiterer Aspekt deutlich. Bisher wurde nur mit computergestützten Sequenzanalysen die Orientierung von Claudinen in der Membran vorhergesagt (Behr M., *et al.* 2003). Biologische Daten, die Aufschluss über die Orientierung von Mega geben, existierten bislang nicht. Hier zeige ich *in vivo* durch das kontrollierte Abspalten des YFP mit zytosolisch lokalisierter TEV-Protease, dass der Mega-C-Terminus zytoplasmatisch orientiert ist.

2.1.6 Die orts- und zeitabhängige Fragmentierung eines Mega-Fusionsproteins in *Drosophila*-Embryonen durch die TEV-Protease

In Kapitel 2.1.5 zeigte ich, dass sich TEV-Protease-vermittelt eine ubiquitäre intrazelluläre Verteilung des YFP durch Abspaltung von membrangebundenen YFP erreichen lässt. Eine interessante Fragestellung ist nicht nur die nach der Funktion eines Proteins in bestimmten Geweben, sondern auch zu welcher Zeit bzw. in welchem Entwicklungsstadium ein Protein eine spezifische Funktion übernimmt. Die Experimente aus 2.1.5 wurden in lebenden Organismen durchgeführt und eine zeitabhängige Induktion der TEV-Protease in *Drosophila*-Embryonen getestet. Hierfür beobachtete ich lebende Mega-TEVpcs-YFP-Embryonen unter einem Leica TCS SP2 Mikroskop. In Abb. 2.1.6 ist die wildtypische Lokalisation von Mega-TEVpcs-YFP durch das Fluoreszenz-Signal des YFP in den SJs des Tracheensystems (Pfeil in Abb. 2.1.6 a) und der Epidermis (Pfeilspitze in Abb. 2.1.6 a) zu erkennen. Wurde die TEV-Protease im Tracheensystem über das GAL4/UAS-System jedoch mit *btl*-GAL4 exprimiert, erschien das YFP nicht mehr in den SJs, sondern ubiquitär in den

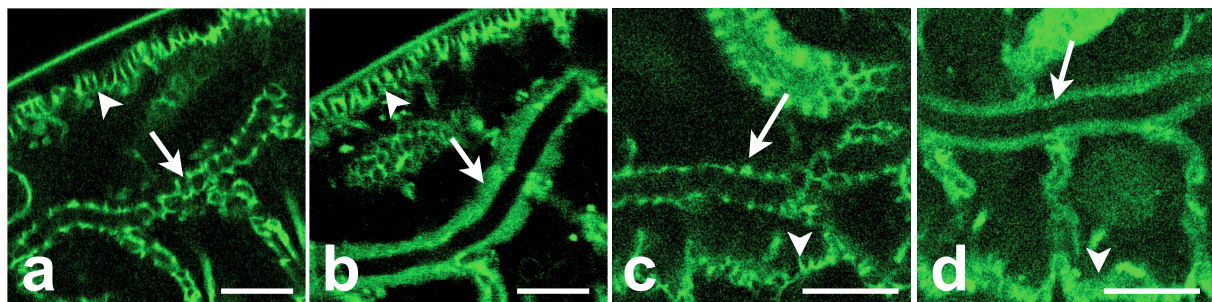


Abb. 2.1.6 TEV-Protease-vermitteltes Fragmentieren eines Mega-Fusionsproteins in lebenden *Drosophila*-Embryonen

Dargestellt ist die Visualisierung von lebenden *Drosophila*-Embryonen im Stadium 16. Die Embryonen tragen entweder das Mega-TEVpcs-YFP *rescue* Konstrukt alleine (a) oder zusammen mit *btl*-GAL4 und UAS-TEV (b). Die auf die SJs begrenzte YFP-Lokalisation in trachealen Zellen (Pfeil in a) geht nach *btl*-GAL4-vermittelter TEV-Protease-Expression spezifisch verloren (Pfeil in a und b), bleibt aber in der Epidermis erhalten (Pfeilspitze in b). In (c) und (d) sind Embryonen dargestellt, die neben dem Mega-TEVpcs-YFP *rescue* Konstrukt auch hs-TEV tragen, bei 25°C inkubiert wurden (c) oder eine Hitzeschockbehandlung Anfang Stadium 16 erfahren haben (d, siehe Material und Methoden). Die spezifische SJs-Lokalisation des YFP im Tracheensystem (Pfeil in c) und der Epidermis (Pfeilspitze in c) geht nach ubiquitärer Hitzeschock-vermittelter TEV-Protease-Expression verloren (Pfeil und Pfeilspitze in d). Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 30µm.

Tracheenzellen verteilt (Pfeil in Abb. 2.1.6 b). Die Lokalisation in der Epidermis war hierbei unverändert (Pfeilspitze in Abb. 2.1.6 b). Dies deutet auf das Abspalten des YFP durch die TEV-Protease von Mega-TEVpcs-YFP im Tracheensystem hin. Diese Ergebnisse entsprechen denen aus 2.1.5, wo die Verteilung von YFP mit Antikörperfärbungen nachgewiesen wurde und verdeutlichen nochmals eine Anwendungsmöglichkeit der TEV-Protease zur *in vivo* Untersuchung von Zielproteinen in selektierten Zellverbänden. Um die Funktion von Proteinen mittels der TEV-Protease in verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen, ist es nötig die Protease zu einem beliebigen Zeitpunkt zu exprimieren. Dies ist durch Kontrolle der TEV-Protease unter dem hsp70-Promotor (hs-TEV) möglich. Stadium 16 Embryonen die Mega-TEVpcs-YFP *rescue* und hs-TEV tragen, zeigten bei 25°C eine wildtypische Lokalisation von Mega-TEVpcs-YFP in den SJs des Tracheensystems (Pfeil in Abb. 2.1.6 c) und der Epidermis (Pfeilspitze in Abb. 2.1.6 c). Inkubierte man nun bei 37°C (siehe Material und Methoden), ging das spezifische Signal des YFP in den SJs verloren und erschien gleichmäßig in den Zellen der Epidermis (Pfeilspitze in Abb. 2.1.6 d) und des Tracheensystems (Pfeil in Abb. 2.1.6 d) verteilt. Dies lässt auf eine ubiquitäre TEV-Protease-Expression nach Hitzeschock schließen und zeigt die zeitlich gesteuerte Abspaltung des YFP von Mega-TEVpcs-YFP in ektodermalen Geweben.

Es ist mir somit erfolgreich gelungen, die TEV-Protease zeitabhängig zu aktivieren und ein ausgesuchtes Zielprotein *in vivo* zu zerschneiden. Ergänzend ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass es in der Nähe der Zellmembran zu einer sterischen Behinderung der TEV-Protease aufgrund der Membran selbst oder von dort lokalisierten Proteinkomplexen kommen könnte. Offenbar funktioniert die TEV-Protease so gut, dass diese Hindernisse überwunden werden. Nachdem ich die proteolytische Aktivität der TEV-Protease *in vivo* an Mega demonstrieren konnte, interessierte ich mich für die Anwendbarkeit der Methode zur Erzeugung möglicher *mega*-Phänokopien. Im nächsten Kapitel soll näher darauf eingegangen werden.

2.1.7 Die gewebespezifische Untersuchung des Mega-C-Terminus in *Drosophila*-Embryonen mit dem TEV-Protease-System

Nachdem ich zeigen konnte, dass in lebenden *Drosophila*-Fliegen Zielproteine orts- und zeitspezifisch mit der TEV-Protease gespalten werden (2.1.4-2.1.6), beschäftigte mich die Frage, ob TEV-Protease-vermittelt Genfunktionen *in vivo* gestört werden können. Um die Gesamtfunktion von Mega besser zu verstehen, ist es wichtig den einzelnen Domänen oder Proteinabschnitten eine mögliche Teilfunktion zuzuordnen. Bislang war es mit den verfügbaren Techniken nicht möglich, eine solche Untersuchung durchzuführen. Manipulationen mittels RNA-Interferenz erfassen nicht einzelne Teilstücke, sondern die Expression des gesamten Proteins. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine um den C-Terminus verkürzte Mega-Variante nicht in die SJs eingebaut wird. Das zugrunde liegende *rescue* Konstrukt ist somit nicht in der Lage, den *mega* mutanten Phänotyp zu retten (Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Um festzustellen, ob sich durch die Expression der TEV-Protease eine Störung von Proteinfunktionen erreichen lässt, ging ich speziell der Frage nach, ob sich *mega*-Phänokopien durch TEV-Protease-vermittelter Spaltung von Mega herstellen lassen. *mega*-Mutanten sind durch einen elongierten und gebogenen dorsalen Hauptast des Tracheensystems und dessen abnormalen, gedehnten Zellen gekennzeichnet. Als erstes klonierte ich ein *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, das für ein Mega-Fusionsprotein codiert. In diesem ist nach der vierten Transmembrandomäne eine TEV-Schnittstelle so eingefügt, dass der möglicherweise essenzielle intrazelluläre C-Terminus von Mega abgegrenzt wird (Abb. 2.1.7 a). *mega* mutante Fliegen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen, sind lebensfähig und fertil. Ich führte anschließend Antikörperfärbungen mit anti-Mega- (detektiert den C-Terminus von Mega), 2A12- (Markiert die Umrandung des Tracheenlumens) und anti-Spectrin- (färbt spezifisch die Zellmembran) Antikörpern durch. Mega-TEVpcs-CTerm erscheint in SJs analog zu WT-Mega lokalisiert (Abb. 2.1.7 b). Darüber hinaus rettet Mega-TEVpcs-CTerm-Expression den *mega* mutanten trachealen Phänotyp

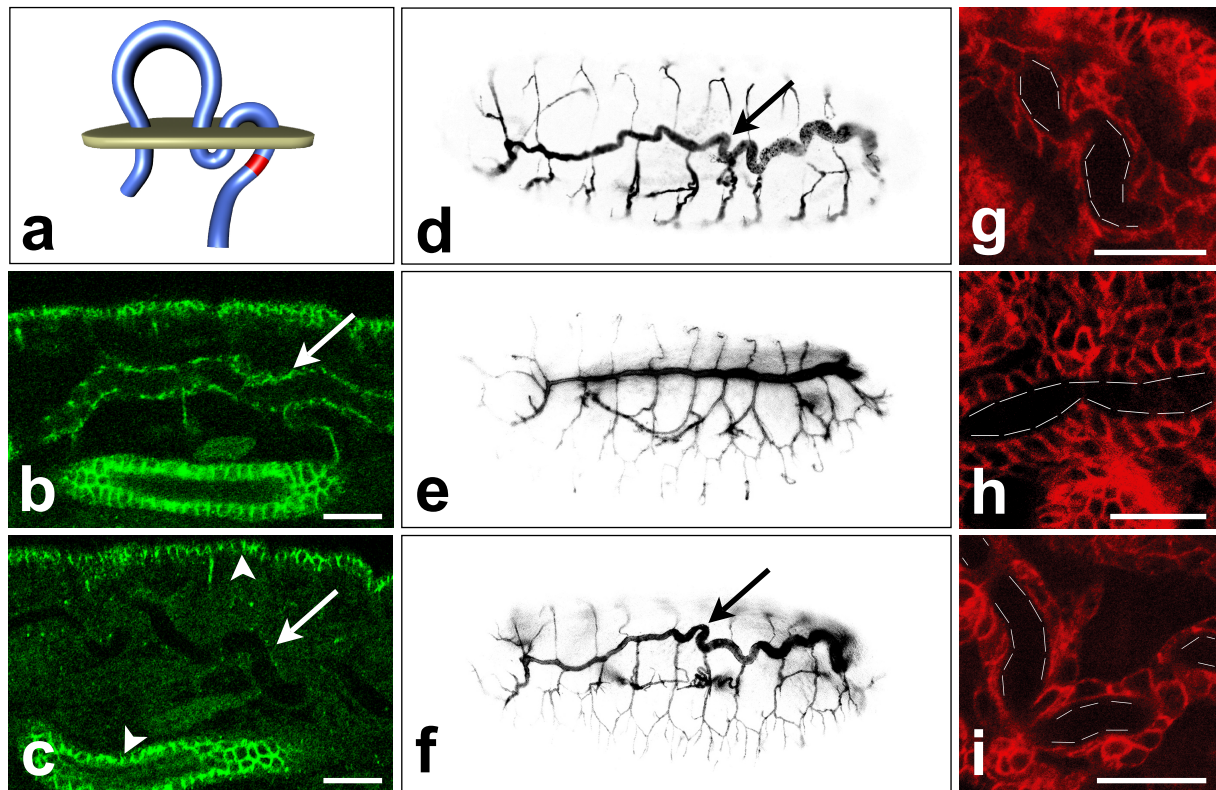


Abb. 2.1.7 TEV-Protease-vermittelte Spaltung von Mega erzeugt tracheale Phänokopien der *mega*-Mutante

Das Schema (a) zeigt das Mega-TEVpcs-CTerm Fusionsprotein. Die TEVpcs (rot) ist nach der vierten Transmembrandomäne in Mega (blau) eingefügt und grenzt den zytoplasmatischen C-Terminus des Proteins ab. Die Membran ist ocker dargestellt. Anti-Mega- (b und c), 2A12- (d-f) und anti-Spectrin- (g-i) Antikörperfärbungen von *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt (b, e und h) tragen, sowie *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV (c, f und i) tragen. In (d) und (g) sind *mega*¹²-Embryonen dargestellt. Der 2A12-Antikörper (d, e und f) färbt spezifisch das Tracheensystem an. Der Pfeil zeigt auf den dorsalen Hauptstamm. Mega-TEVpcs-CTerm-Embryonen zeigen eine Lokalisation des Fusionsproteins in den SJs (Pfeil in b; Tracheensystem), wildtypische Morphogenese des Tracheensystems (e) und eine wildtypische tracheale Zellform (h; Behr M. *et al.*, 2003). Exprimiert man dagegen *btl*-GAL4-vermittelt die TEV-Protease im trachealen Zellen, die im mutanten *mega* Hintergrund das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen, so kommt es zu einem trachealen Phänotyp (f) mit veränderter Zellform (i; Behr M. *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp ist von der *mega*-Funktionsverlustmutante nicht zu unterscheiden (vergleiche d mit f und g mit i). Weiterhin ist es mit dem gegen den Mega-C-Terminus gerichteten anti-Mega-Antikörper (Behr M. *et al.*, 2003) nicht mehr möglich das Fusionsprotein nach der Proteolyse mit der TEV-Protease im Tracheensystem zu detektieren (Pfeil in c), aber noch in der Epidermis und im Hinterdarm (Pfeilspitzen in c). Möglicherweise wird der C-Terminus nach dem Abspalten schnell degradiert. Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 20μm.

(vergleiche Abb. 2.1.7 d mit e und Abb. 2.1.7 g mit h). Erfolgt nun die tracheale Expression der TEV-Protease in *mega* mutanten Embryonen, die mit Mega-TEVpcs-CTerm gerettet wurden, kommt es zu Phänokopien des trachealen mutanten *mega* Phänotyps (Kurzform: Mega-ΔCTerm, Abb. 2.1.7 f und i). Diese Phänokopien sind nicht von deformierten *mega* mutanten Tracheenzellen (vergleiche Abb. 2.1.7 g mit i) und dem elongierten und gebogenen dorsalen Hauptstamm (vergleiche Abb. 2.1.7 d

mit f) *mega* mutanter Embryonen zu unterscheiden. Da Mega mit dem gegen seinen C-Terminus gerichteten anti-Mega-Antikörper im Tracheensystem nicht mehr detektiert werden kann (Pfeil in Abb. 2.1.7 c), ist die Proteolyse scheinbar vollständig und der C-Terminus wird offensichtlich schnell degradiert. Jedoch wäre es auch denkbar, dass strukturelle Veränderungen an Mega nach dem Schnitt durch die TEV-Protease die Detektion durch den Antikörper behindern. Unprozessiertes Mega-TEVpcs-CTerm-Protein ist dabei weiterhin in den umliegenden Geweben vorhanden (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.7 c). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich mit der Expression der TEV-Protease Zielproteine gezielt so manipulieren lassen, dass sie in ihrer Funktion gestört werden.

2.1.8 Der Mega-C-Terminus beeinflusst nicht die Lokalisierung von *septate junctions*-Markerproteinen

Es ist mir gelungen, mittels des TEV-Protease-Systems die Funktion des *Drosophila*-Claudins Mega zu stören und tracheale *mega*-Phänokopien durch das TEV-Protease-vermittelte Abspalten des C-terminalen Mega-Abschnitts (Kurzform: Mega-ΔCTerm) zu erzeugen (siehe 2.1.7). Es wurde gezeigt, dass SJs-Komponenten für den normalen SJs-Aufbau notwendig sind (Behr M. *et al.*, 2003; Wu V. *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob der Mega-C-Terminus ebenfalls für den Aufbau und Erhalt der SJs notwendig ist, studierte ich die Integrität der SJs in Mega-ΔCTerm-Embryonen.

In *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹²) sind die SJs zerstört. Dies ist neben dem Verlust der Septa in der Ultrastruktur auch in der Misslokalisierung von SJs-Markern zu erkennen. So sind in *mega*¹²-Embryonen Coracle (Fehon RG. *et al.*, 1994) und

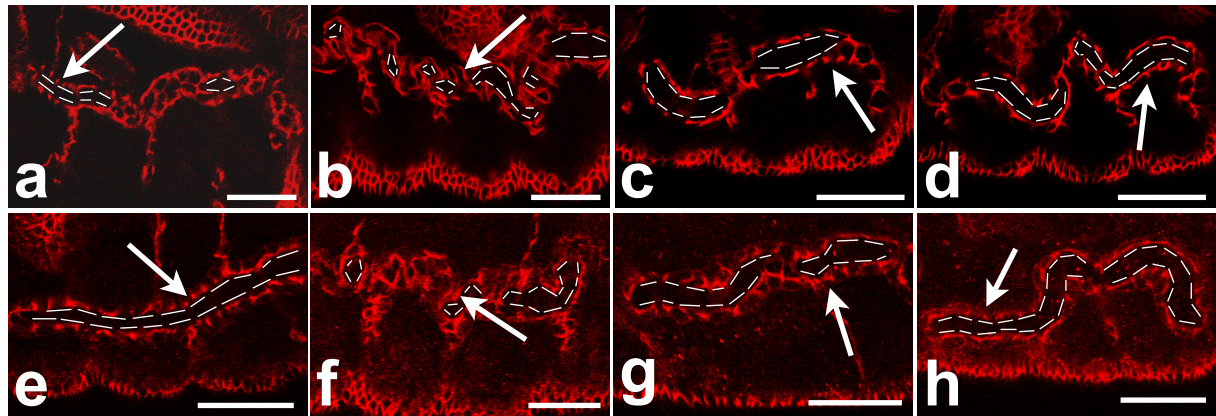


Abb. 2.1.8.1 TEV-Protease-vermittelte *mega*-Phänokopien zeigen einen trachealen *mega*¹²-Phänotyp, aber abnormale Verteilung von *septate junctions*-Markerproteinen in *Drosophila*-Embryonen

Dargestellt sind anti-Fasciclin III- (a-d) und anti-Coracle- (e-h) Antikörperfärbungen von Stadium 16 WT-Embryonen (a und e), *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹², b und f), *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen (c und g) sowie *mega* mutante Embryonen mit *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV (Mega-ΔCTerm, d und h). Die weißen Striche umranden das Tracheenlumen des dorsalen Hauptastes. In WT-Embryonen sind Fasciclin III sowie Coracle in den SJs lokalisiert (Pfeile in a und e) und das Tracheensystem besitzt eine normale Form. In *mega* mutanten Embryonen sind die SJs offenbar zerstört (Behr M. *et al.*, 2003), die SJs-Marker misslokalisiert und das tracheale Lumen elongiert (Pfeile und Linien in b und f). *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* verhindert in *mega* mutanten Embryonen die Misslokalisierung von Fasciclin III und Coracle (Pfeile in c und g) und führt zu einem normalen Tracheensystem. Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen besitzen einen gebogenen, elongierten dorsalen Hauptast wie *mega*¹²-Embryonen, aber eine normale, wildtypische Lokalisierung der SJs-Marker Fasciclin III und Coracle (Pfeile in d und h). Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 30μm.

Fasciclin III (Woods DF *et al.*, 1997) entlang der basolateralen Seite der epithelialen Zellen misslokalisiert, während sie in WT-Embryonen auf die SJs beschränkt sind (Behr M. *et al.*, 2003). Dies geht auch aus Abb. 2.1.8.1 hervor. In WT-Embryonen ist nach Antikörperfärbungen eine normale Lokalisierung von Fasciclin III (Pfeil in Abb. 2.1.8.1 a) und Coracle (Pfeil in Abb. 2.1.8.1 e) zu erkennen, wogegen sowohl Fasciclin III (Pfeil in Abb. 2.1.8.1 b) als auch Coracle (Pfeil in Abb. 2.1.8.1 f) in *mega*¹²-Embryonen misslokalisiert sind. *mega* mutante Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen, sind lebensfähig und besitzen ein normales Tracheensystem (siehe 2.1.7, Abb. 2.1.8.1 c und g). Es ist nicht nur das Mega-TEVpcs-CTerm-Fusionsprotein in den SJs zu beobachten (Abb. 2.1.7 b), sondern die SJs-Marker Fasciclin III und Coracle sind ebenfalls wildtypisch lokalisiert (Abb. 2.1.8.1 c und g). Erfolgt nun *btl*-GAL4-vermittelt die Proteolyse des C-Terminus von Mega-TEVpcs-CTerm in geretteten *mega* mutanten Embryonen durch die TEV-Protease, so entsteht eine tracheale *mega*-Phänokopie. Es tritt ein elongierter, gebogener dorsaler Hauptast des Tracheensystems sowie eine veränderte Form der trachealen Zellen in Erscheinung (Vergleiche gestrichelte Linien in Abb. 2.1.8.1 c mit d und Abb. 2.1.8.1 g mit h). Die SJs-Marker Fasciclin III und Coracle werden allerdings nicht misslokalisiert (Pfeile in Abb. 2.1.8.1 d und h). Diese Ergebnisse waren sehr überraschend, denn sie deuten auf eine Erhaltung einer dafür wichtigen Funktion der SJs nach dem Abschneiden des Mega-C-Terminus hin, während dies in *mega*-Funktionsverlustmutanten nicht mehr gegeben ist. Offenbar werden die SJs nur modifiziert und nicht gänzlich zerstört.

Um festzustellen, ob TEV-Protease-vermittelte *mega*-Phänokopien tatsächlich auf die Spaltung des Mega-C-Terminus zurückzuführen sind oder durch eine fehlerhafte SJs-Integration von Mega-TEVpcs-CTerm nach TEV-Protease-Expression entstehen, führte ich anti-Mega-Antikörperfärbungen durch. Ich verwendete Antikörper, die den Mega-N-Terminus (anti-NTerm) detektieren, und Antikörper die den C-Terminus (anti-CTerm) von Mega erkennen. Stadium 16 *mega* mutante

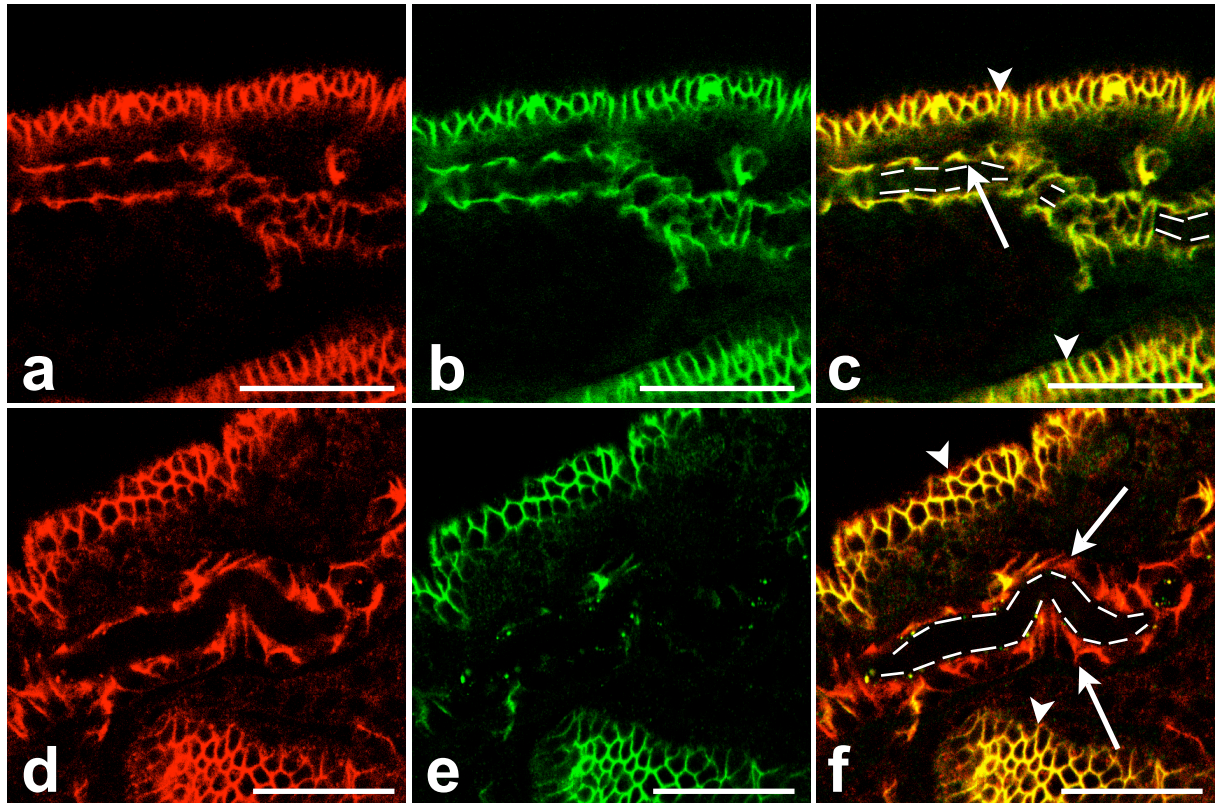


Abb. 2.1.8.2 Nach TEV-Protease-vermittelten *mega*-Phänokopien ist das Mega-Protein in den *septate junctions* lokalisiert.

Dargestellt sind anti-NTerm-Mega- (rot in a und d, als Überlagerung in c und f) und anti-CTerm-Mega- (grün in b und e, als Überlagerung in c und f) Antikörperfärbungen von Stadium 16 *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen (a-c) und von *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen (d-f). Die weißen Striche umranden das Tracheenlumen des dorsalen Hauptastes. In *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen, erkennen die Antikörper den N-Terminus (a) und den C-Terminus (b) des Mega-Fusionsproteins in der Epidermis und im Hinterdarm (Pfeilspitzen in c) sowie im Tracheensystem (Pfeil in c). In *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen, erkennt der anti-NTerm-Mega-Antikörper (d) das Protein in der Epidermis, im Hinterdarm und im Tracheensystem (Pfeile und Pfeilspitzen in f), wogegen der anti-CTerm-Mega-Antikörper (e) das Protein in der Epidermis und im Hinterdarm detektiert (Pfeilspitzen in f), aber nur sehr schwach im Tracheensystem (Pfeile in f). Zu erkennen ist die Lokalisation des Mega-N-Terminus in den SJs (Pfeile in f) sowie der elongierte dorsale Hauptast (*mega*-Phänokopie, gestrichelte Linien in f). Mega-TEVpcs-CTerm wird somit in die SJs integriert und die *mega*-Phänokopien sind auf die Spaltung des Mega-C-Terminus durch die TEV-Protease zurückzuführen. Die weißen Balken entsprechen 30µm.

Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen (Abb. 2.1.8.2 a-c), zeigen Kolokalisierung der C- und N-terminalen Mega-Epitope in der Epidermis, im Hinterdarm (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.8.2 c) sowie im Tracheensystem (Pfeil in Abb. 2.1.8.2 c). In Mega-ΔCTerm Embryonen detektierte der anti-NTerm-Antikörper (Abb. 2.1.8.2 d) das Mega-Protein in der Epidermis, im Hinterdarm (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.8.2 f) und im Tracheensystem (Pfeile in Abb. 2.1.8.2 f). Der anti-CTerm-Antikörper

(Abb. 2.1.8.2 e) detektierte nur noch schwach den Mega-C-Terminus im Tracheensystem (Pfeile in Abb. 2.1.8.2 f). Diese Detektion des Antigens durch den anti-Mega-CTerm-Antikörper deutet auf verbliebene geringe Mengen von membranständigem, ungespaltenem Mega-TEVpcs-CTerm-Protein hin. Der Nachweis von ungespaltenem Mega-C-Terminus in manchen trachealen Zellen (Abb. 2.1.8.2 e und f) ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Expressionshöhen der TEV-Protease durch das GAL4/UAS-System zurückzuführen. Zusammenfassend wird deutlich, dass das Mega-Fusionsprotein in die SJs eingebaut wird und die *mega*-Phänokopien (elongierter dorsaler Hauptast, gestrichelte Linien in Abb. 2.1.8.2 f) durch TEV-Protease-vermitteltes Abspalten des C-Terminus erzeugt werden.

2.1.9 Mega- Δ Cterm-Embryonen verfügen über eine transepitheliale Barriere im Tracheensystem

Ich habe erste Indizien vorgestellt, die vermuten lassen, dass in Mega- Δ Cterm-Embryonen, trotz der trachealen Phänokopie von *mega*-Mutanten, wildtypähnliche SJs im Tracheensystem anzutreffen sind. Dies stützt sich auf die Beobachtung der normal lokalisierten SJs-Marker Fasciclin III und Coracle (siehe 2.1.8). Um zu überprüfen, ob tracheale SJs in *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-Cterm *rescue* Konstrukt tragen und *btl*-GAL4-vermittelt die TEV-Protease exprimieren (Kurzform: Mega- Δ Cterm), noch intakt sind, führte ich Mikroinjektionen mit Texas-Red-Dextran 10000 MW an Stadium 17 Embryonen (siehe Material und Methoden) verschiedener Genotypen durch. Texas-Red-Dextran 10000 MW ist ein rot fluoreszierender Farbstoff der an ein 10kDa großes Dextran-Molekül gekoppelt ist. Normal funktionierende epitheliale Gewebe verhindern die parazelluläre Diffusion solcher großen Stoffe (Behr M. *et al.*, 2003; Tsukita S. & Furuse M., 2002). In *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹²) ist die transepitheliale Barriere aufgrund fehlender SJs gestört. Es kommt nach Mikroinjektion des Texas-Red-Dextrans zu einer Akkumulierung dieses Farbstoffes in Hohlräumen wie etwa dem Tracheenlumen (Behr M. *et al.*, 2003). Ich beobachtete 60 Minuten nach der Injektion von Texas-Red-Dextran 10000 MW in WT-Embryonen eine Verteilung des Farbstoffes in der Hämolymphe, aber nicht im Tracheenlumen (Pfeilspitze in Abb. 2.1.9 a). Die intakte *barrier function* verhinderte die Diffusion durch das Tracheenepithel (Pfeil in Abb. 2.1.9 a). Nach Injektion von *mega*¹²-Embryonen kam es nach 60 Minuten zu einer Anreicherung des Farbstoffes im Tracheenlumen (Pfeilspitze in Abb. 2.1.9 b). Offenbar ist der Farbstoff durch das Epithel (Pfeil in Abb. 2.1.9 b) durchgewandert. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass eine Perforation des Tracheensystems mit der verwendeten Mikroinjektionstechnik in den anterioren Pol weitgehend vermieden wird (siehe Material und Methoden). Daher ist das Füllen des dorsalen Hauptastes mit dem Farbstoff durch Verletzungen unwahrscheinlich und nur auf die

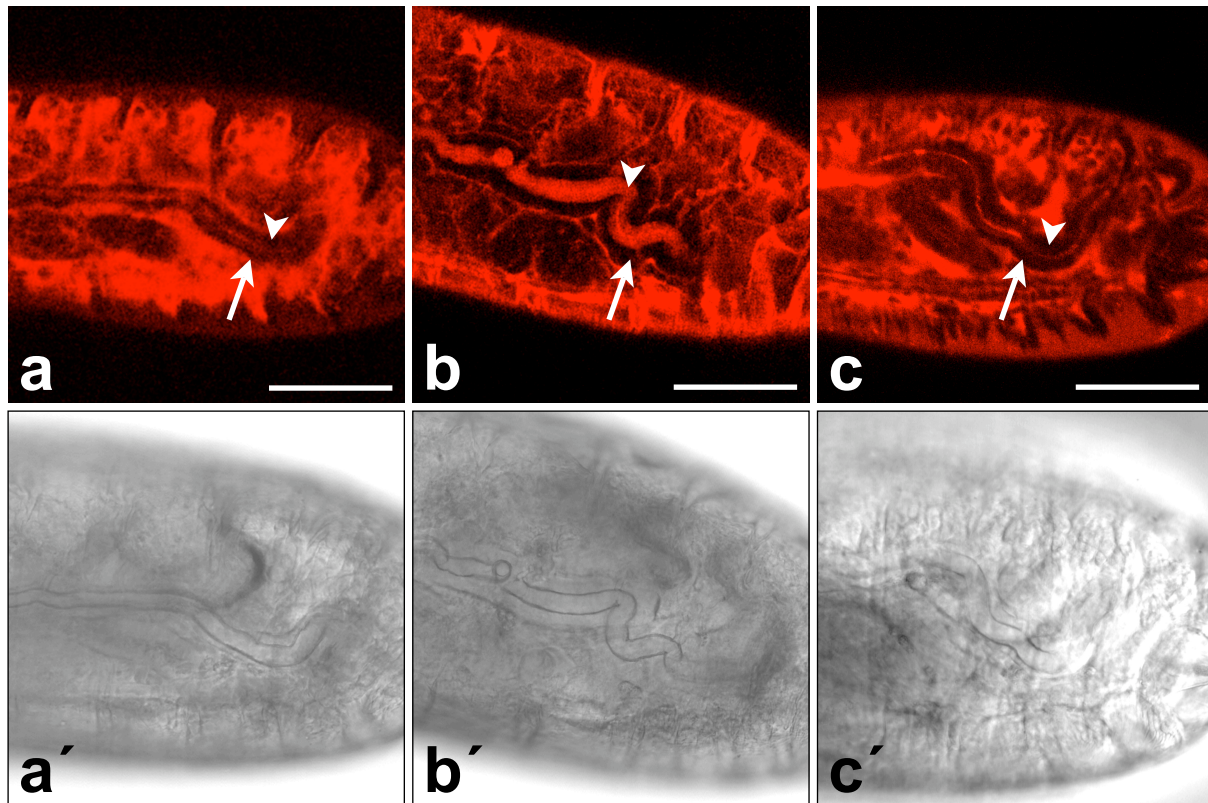


Abb. 2.1.9 TEV-Protease-vermittelte *mega*-Phänokopien zeigen keine *barrier function* Defekte in *Drosophila*-Embryonen

Konfokale Aufnahmen von lebenden *Drosophila*-Embryonen nach Mikroinjektion von Texas-Red-Dextran 10000 MW. Abgebildet ist konfokal (a-c) die Verteilung des Texas-Red-Dextran und die zugehörigen Durchlichtaufnahmen (Transmission, a'-c') im WT-Embryo (a und a'), im *mega* mutanten Embryo (*mega*¹², b und b') sowie in einem *mega* mutanten Embryo der das *mega*-TEVpcs-Cterm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV trägt (c und c'). 60 Minuten nach Injektion von WT-Embryonen ist die Hämolymphe mit dem Texas-Red-Dextran angefärbt. Ausgespart bleiben die Tracheenzellen (Pfeil in a) und das Tracheenlumen (Pfeilspitze in a). Der schmale Strich im Tracheenlumen ist eine Reflexion, die durch die Transmissionsaufnahme (a') erzeugt wurde. 60 Minuten nach Injektion von *mega*¹²-Embryonen ist, abgegrenzt durch die Tracheenzellen (Pfeil in b), eine Anreicherung des Texas-Red-Dextran im Tracheenlumen zu erkennen (Pfeilspitze in b). Auffallend ist hier der erweiterte und geschwungene dorsale Hauptast. *mega* mutante Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-Cterm *rescue* Konstrukt tragen und *btl*-GAL4-vermittelt die TEV-Protease exprimieren, weisen ebenfalls einen erweiterten und gebogenen dorsalen Hauptast des Tracheensystems auf. Allerdings ist im Gegensatz zu (b) 60 Minuten nach Injektion keine Füllung des Tracheenlumens mit Texas-Red-Dextran zu erkennen (Tracheenzellen: Pfeil in c. Tracheenlumen: Pfeilspitze in c). Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 60µm.

physiologischen Eigenschaften des Gewebes zurückzuführen. Nach der Injektion von *Mega*-ΔCterm-Embryonen konnte nach einer Stunde keine Anreicherung des Farbstoffes im Tracheenlumen festgestellt werden (Pfeilspitze in Abb. 2.1.9 c). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass nach der TEV-Protease-vermittelten Proteolyse des C-Terminus von *Mega*-TEVpcs-Cterm die SJs soweit erhalten bleiben, dass es nicht zur Störung der *barrier function* kommt. Dies ist konsistent mit den Daten aus 2.1.8, die

zeigen, dass die SJs-Marker Fasciclin III und Coracle wildtypähnlich lokalisiert sind. Daher können einige wichtige Aussagen gemacht werden: SJs in Mega- Δ C-Term-Embryonen sind durch das Abspalten des C-Terminus modifiziert. Trotz des Entstehens einer trachealen *mega*-Phänokopie hat dies keine Auswirkung auf die Lokalisierung von SJs-Markern und die *barrier function*. Dies würde bedeuten, dass nur das Fehlen des Mega-C-Terminus in den SJs das abnormale Tracheensystem und die veränderte Zellform bedingt. Hilfreich für eine mögliche Erklärung dieser Beobachtungen war der Bericht von Tønning A. und Mitarbeiter über ein transientes Chitinfilament im Tracheenlumen (Tønning A. *et al.*, 2005). Wenn dieses Filament nicht wildtypisch ausgebildet wird, kommt es zu ähnlichen trachealen Phänotypen wie bei *mega* mutanten Embryonen (Luschnig S. *et al.*, 2006) oder auch *mega*-Phänokopien. Dieser Sachverhalt weckte mein Interesse und ich studierte das Chitinfilament an verschiedenen Fliegenlinien genauer. Die Ergebnisse sind im nächsten Kapitel zusammengefasst.

2.1.10 Die TEV-Protease-vermittelte Proteolyse von Mega-TEVpcs-CTerm erzeugt ein abnormales Chitinfilament im Tracheenlumen

Die Resultate aus den Kapiteln 2.1.8 und 2.1.9 zeigen deutlich, dass TEV-Protease-System-vermittelte tracheale *mega*-Phänokopien nicht mit der Störung der transepithelialen Barriere oder der Lokalisierung von SJs-Markern verknüpft sind, sondern einen anderen physiologischen Ursprung haben müssen.

Es wurde in *Drosophila* ein Chitinfilament entdeckt, das während der Embryogenese im Tracheenlumen auftritt. Untersuchungen führten zur Entdeckung von Mutationen, die eine wildtypische Ausbildung des Chitinfilaments verhindern und dadurch ebenfalls ein elongiertes, abnormales Tracheensystem hervorrufen. Unter diesen befindet sich auch die *mega*-Mutante. Es wurde vermutet, dass SJs-Komponenten für eine normale Organisation des Chitins notwendig sind (Tonning A. *et al.*, 2005). Um zu prüfen, ob TEV-Protease-vermittelte *mega*-Phänokopien ebenfalls das Chitinfilament betreffen, färbte ich jeweils Stadium 16 WT-Embryonen, *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹²), *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Transgen tragen (Mega-TEVpcs-CTerm) sowie *mega* mutanten Embryonen, die *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue*, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen (Mega-ΔCTerm) mit Chitin-binding Probe an (CBP, siehe Material und Methoden). Dieses Reagenz bindet sehr spezifisch an Chitin (Abb. 2.1.10 b, e, h und k sowie Pfeil in Abb. 2.1.10 c, f, i und l). Zur Visualisierung der Zellgrenzen, erfolgte eine Gegenfärbung mit anti-Spectrin. (Abb. 2.1.10 a, d g und j). In WT-Embryonen war ein normal organisiertes Chitinfilament zu beobachten (Pfeil in Abb. 2.1.10 c). Dieses ist gekennzeichnet durch schmale Lücken zwischen den Tracheenzellen und dem Chitin (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.10 c). *mega* mutante Embryonen zeigten dagegen einen Phänotyp, der sich durch fehlende Lücken auszeichnet (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.10 f). Ein weiterer Unterschied soll in der Struktur des Filaments zu finden sein (Tonning A. *et al.*, 2005). Demnach zeigen WT-Embryonen ein faseriges Filament, wogegen das

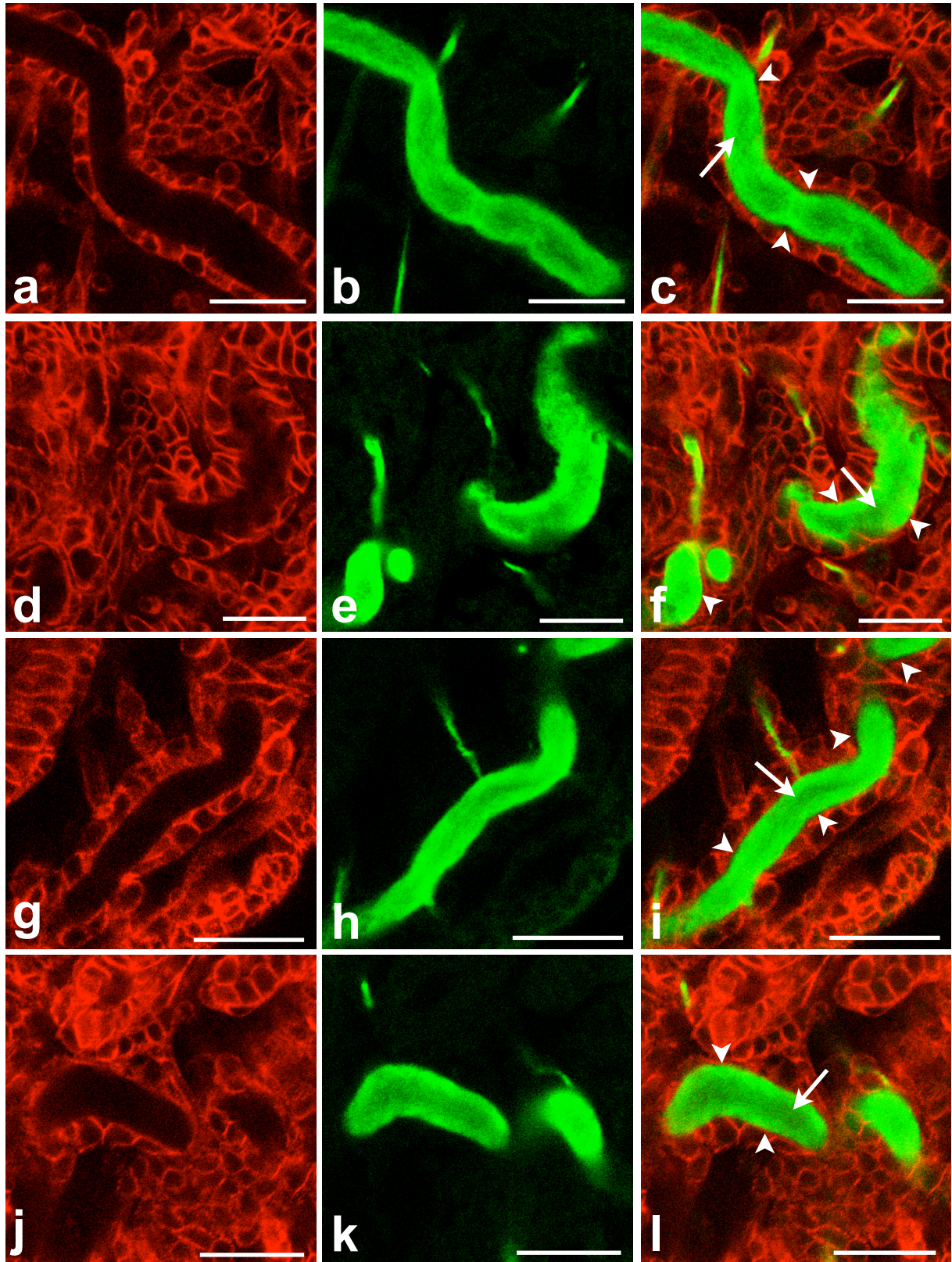


Abb. 2.1.10 TEV-Protease-vermittelte Proteolyse von Mega-TEVpcs-CTerm erzeugt ein abnormales Chitinfilament im Tracheenlumen

Dargestellt sind anti-Spectrin-Antikörperfärbungen (rot in a, d, g, und j) und Chitin-binding Probe- (CBP-) Färbungen (grün in b, e, h und k) von Stadium 16 WT-Embryonen (a-c), *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹²; d-f), *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt (g-i) sowie von *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen (j-l). Im WT-

Tracheenlumen ist ein wildtypisches Chitinfilament (Pfeil in c) anzutreffen. Dieses zeichnet sich durch schmale Lücken zwischen apikaler Seite der Tracheenzellen und dem Filament aus (Pfeilspitzen in c). In *mega* mutanten Embryonen ist das Chitinfilament (Pfeil in f) missorganisiert. Die typischen Lücken zwischen den Zellen und dem Filament fehlen (Pfeilspitzen in f) und die Struktur ist möglicherweise diffuser (siehe auch Tonning A. *et al.*, 2005). *mega* mutante Embryonen deren Phänotyp mit *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* gerettet wurde, zeigen ein wildtypisches Chitinfilament mit typischen Lücken (Pfeilspitzen in i. Vergleiche c mit i) und einer offenbar struktureicheren Erscheinung (Pfeil in i). Kommt es in *mega* mutanten Embryonen, die *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt tragen *btl*-GAL4-vermittelt zur TEV-Protease-Expression, erfolgt eine Phänokopie der *mega*-Mutante am Chitinfilament. Diese zeichnet sich durch das Fehlen der Lücken zwischen apikaler Seite der trachealen Zellen und Chitinfilament (Pfeilspitzen in l) sowie einer möglicherweise diffuseren Struktur des Filaments (Pfeil in l) aus. Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 20µm.

Chitin in *mega* mutanten Embryonen eher diffus erscheint. Eine solche Aussage ist jedoch schwierig zu treffen, da nach eigenem Ermessen zu beurteilen wäre, ob eine Faserstruktur vorliegt oder nicht. Bei Mega-TEVpcs-CTerm-Embryonen ließ sich ein wildtypisches Chitinfilament mit einer typischen Lücke zwischen trachealen Zellen und Chitin (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.10 i) beobachten. Der *mega* mutante Phänotyp wurde somit durch das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Transgen gerettet. Mega-ΔCTerm-Embryonen offenbarten ein Chitinfilament wie es aus Mutanten von SJs-Komponenten bekannt ist. Analog zu *mega* mutanten Embryonen fehlten die Lücken zwischen Tracheenzellen und Chitinfilament (Pfeilspitzen in Abb. 2.1.10 l). Dieser Befund zeigt, dass der C-Terminus von Mega maßgeblich an der wildtypischen Ausbildung des Filaments beteiligt ist. Es sind zwei Enzyme beschrieben worden, die eine entscheidende Funktion in der Organisation von Chitin in der apikalen extrazellulären Matrix ausüben. Serpentine (Serp) und Vermiform (Verm) vermitteln vermutlich eine N-Deacetylierung des Chitins im Tracheenlumen (Luschnig S. *et al.*, 2006). Studien an *sinuous*- (*sinu*-) Mutanten zeigten eine gestörte Exozytose von Verm im embryonalen Tracheensystem (Wang S. *et al.*, 2006). Sinu ist ein weiteres Claudin in *Drosophila* und an der korrekten Ausbildung der SJs und der *barrier function* beteiligt. Ebenfalls wie bei *mega*¹² ist in *sinu* mutanten Embryonen ein elongiertes und gebogenes Tracheensystem zu erkennen (Wu V. *et al.*, 2004). Neben dem Fehlen des Matrixproteins Verm im Tracheenlumen wurde ein zu *mega* mutanten Embryonen identisches aberrantes Chitinfilament beobachtet (Wang S. *et al.*, 2006). Möglicherweise ist diese fehlerhafte Chitinstruktur in *mega*¹²-Embryonen durch

mangelnde Serp- und Verm-Aktivität aufgrund einer gestörten Exozytose zu erklären. Eine Missorganisation des Filaments ist auch bei Mega- Δ C-Term-Embryonen zu erkennen (Abb. 2.1.10 l). Dies könnte bedeuten, dass der C-Terminus an der korrekten Exozytose der chitinmodifizierenden Proteine Serp und Verm beteiligt ist. Zur Untersuchung der Exozytose im Tracheensystem wurden anti-Serp- und anti-Verm-Antikörperfärbungen durchgeführt. Das nächste Kapitel stellt die Ergebnisse vor.

2.1.11 Die TEV-Protease-vermittelte Proteolyse von Mega-TEVpcs-CTerm interferiert mit der Exozytose im Tracheensystem

Ich ging der Fragestellung nach, ob das aberrante Chitinfilament, das in *mega* mutanten Embryonen und in Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt (Mega-TEVpcs-CTerm), *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen (Mega-ΔCTerm) auftritt (siehe 2.1.10), auf die fehlerhafte Exozytose von chitinmodifizierenden Enzymen zurückzuführen ist (Wang S. *et al.*, 2006). Hierzu führte ich anti-Serpentine- (Serp, Abb. 2.1.11 a-d) und anti-Vermiform- (Verm, Abb. 2.1.11 e-h) Antikörperfärbungen an WT-Embryonen, *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹;

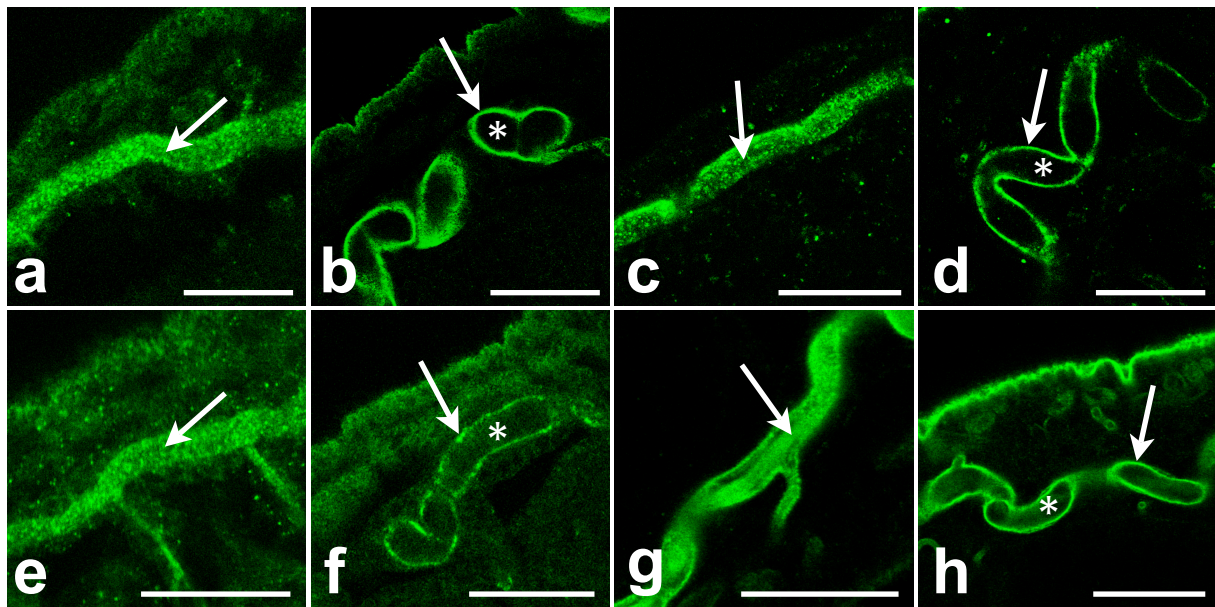


Abb. 2.1.11 Die TEV-Protease-vermittelte Proteolyse von Mega-TEVpcs-CTerm offenbart eine gestörte Exozytose von Serpentine und Vermiform im Tracheensystem bei *Drosophila*-Embryonen

Dargestellt sind anti-Serp- (a-d) und anti-Verm- (e-h) Antikörperfärbungen von Stadium 16 WT-Embryonen (a und e), *mega* mutanten Embryonen (*mega*¹, b und f), *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt (c und g) sowie von *mega* mutanten Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen (d und h). In WT-Embryonen ist das Serp- (a) und das Verm-Protein (e) im Tracheenlumen lokalisiert. In *mega* mutanten Embryonen befindet sich Serp und Verm apikal in der Nähe der Membran (Pfeil in b und f) und fehlt im Tracheenlumen (Sternchen in b und f). Offenbar wird das Protein nicht in das Tracheenlumen transportiert. *mega*¹ (Küstner K., unpubliziert) ist wie *mega*¹² eine *mega*-Funktionsverlustmutante. *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* ermöglicht in *mega* mutanten Embryonen die Sekretion des Serp- (Pfeil in c) und des Verm-Proteins (Pfeil in g) in das Tracheenlumen. Embryonen, die das *mega*-TEVpcs-CTerm *rescue* Konstrukt, *btl*-GAL4 und UAS-TEV tragen (Mega-ΔCTerm) offenbaren eine gestörte Exozytose von Serp und Verm im Tracheensystem. Serp und Verm befinden sich apikal der Membran (Pfeil in d und h) und das Tracheenlumen verbleibt ausgespart (Sternchen in d und h). Dies deutet auf eine essenzielle Funktion des Mega-C-Terminus bei der Exozytose hin. Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 30μm.

Küstner K., unpubliziert), Mega-TEVpcs-CTerm-Embryonen sowie an Mega- Δ CTerm-Embryonen durch. In WT-Embryonen war eine normale Lokalisierung von Serp und Verm im Tracheenlumen zu erkennen (Pfeil in Abb. 2.1.11 a und e). *mega* mutante Embryonen zeigten dagegen das Serp- und Verm-Protein an der apikalen Tracheenzellmembran misslokalisiert (Pfeil in Abb. 2.1.11 b und f). Das Tracheenlumen war frei von Serp und Verm (Sternchen in Abb. 2.1.11 b und f). Diese Daten deuten auf eine fehlerhafte Exozytose von Serp und Verm in *mega*¹-Embryonen hin, wie sie für Verm auch bei *sinu*-Mutanten beschrieben worden ist (Wang S. *et al.*, 2006). Mega-TEVpcs-CTerm-Embryonen zeigten eine wildtypische Lokalisierung von Serp und Verm im Tracheenlumen (Pfeil in Abb. 2.1.11 c und g). Die Exozytose war hier nicht gestört. Mega- Δ CTerm-Embryonen zeigten jedoch einen trachealen Phänotyp, der nicht vom *mega* mutanten Phänotyp zu unterscheiden war. Diese Embryonen wiesen eine Misslokalisierung des Serp- und Verm-Proteins an der apikalen Tracheenzellmembran (Pfeil in Abb. 2.1.11 d und h) auf, während die Proteine im Tracheenlumen fehlten (Sternchen in Abb. 2.1.11 d und h). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der C-Terminus von Mega für die normale Exozytose von Serp und Verm in die apikale extrazelluläre Matrix essenziell ist. Wird dieser Prozess gestört, entwickelt sich ein abnormales Chitinfilament, das vermeintlich für die Elongation des Tracheensystems verantwortlich ist (Tonning A. *et al.*, 2005). Dieser Befund wurde erst durch die Verwendung des in dieser Arbeit vorgestellten TEV-Protease-Systems möglich.

2.1.12 Eine mit einem Signalpeptid erweiterte TEV-Protease wird in das Tracheenlumen sezerniert

Neben den vorgestellten Analysen zur Funktion des Mega-C-Terminus sind auch Untersuchungen anderer Domänen von Megatrachea wie den extrazellulären Bereichen denkbar. Ebenso könnten Liganden von Signaltransduktionskaskaden Ziel der TEV-Protease sein.

Um solche Experimente durchzuführen, ist eine sezernierte TEV-Protease nötig. Hierzu generierte ich ein TEV-Protease-Fusionskonstrukt, dass für eine mit einem Wingless-Signalpeptid (Han C. *et al.*, 2005)

und mCherry (Shaner NC. *et al.*, 2005) erweiterte TEV-Protease codiert (Kurzform: WgSP-mCherry-TEV, Abb. 2.1.12 a). Nach *btl*-GAL4-

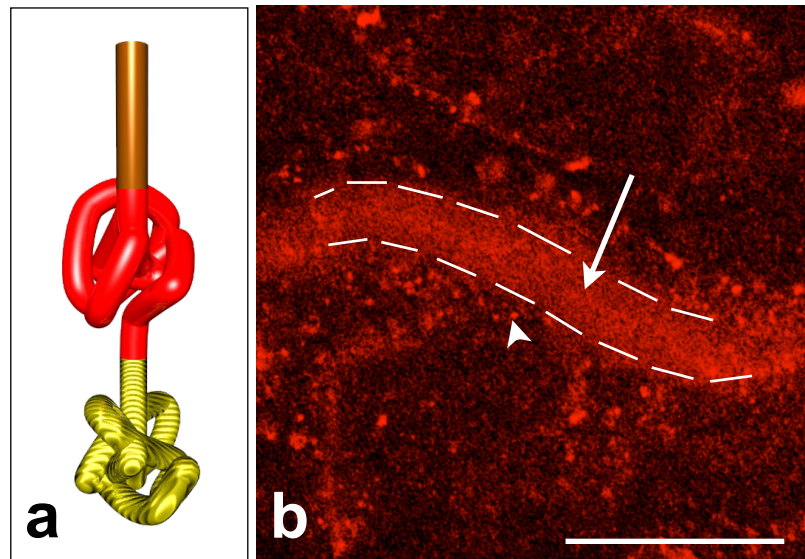


Abb. 2.1.12 WgSP-mCherry-TEV akkumuliert *btl*-GAL4-vermittelt im Tracheenlumen

Das Schema (a) stellt das WgSP-mCherry-TEV-Fusionsprotein dar. Das Wingless-Signalpeptid ist orange, mCherry rot und die TEV-Protease gelb abgebildet. Nach *btl*-GAL4-vermittelter Expression zeigt sich im Tracheenlumen (zwischen den weißen Linien in b) eine Akkumulation des WgSP-mCherry-TEV-Fusionsproteins (Pfeil in b). In den Zellen ist das WgSP-mCherry-TEV punktförmig verteilt (Pfeilspitze in b). Anterior ist links und dorsal ist oben. Der weiße Balken entspricht 30 μ m.

vermittelter Expression des Fusionsproteins in Stadium 16 Embryonen kam es *in vivo* im Tracheenlumen zu einer Akkumulation von WgSP-mCherry-TEV (Pfeil in Abb. 2.1.12 b). Dies deutet auf dessen Sekretion hin. Zusätzlich erschien das Signal punktförmig in den trachealen Zellen lokalisiert (Pfeilspitze in Abb. 2.1.12 b). Möglicherweise ist dies in Vesikel verpacktes WgSP-mCherry-TEV-Protein, das zur Membran transportiert wird. Diese sezernierte TEV-Protease ist ein erster experimenteller Schritt zur Analyse von extrazellulär lokalisierten Proteinen.

2.2 Hot Dog ist eine putative Calcium-Kanal Gamma Untereinheit

Während meiner Diplomarbeit 2005 untersuchte ich das claudinähnliche *Drosophila*-Gen *hot dog* (*hot*, CG6398). Das Genprodukt wurde mittels computergestützten Sequenzanalysen als eines von sieben Claudinähnlichen in *Drosophila* entdeckt (Behr M. *et al.*, 2003; Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Während der Erstellung dieser vorgelegten Arbeit stieß ich auf Hinweise, die dem Hot-Protein eine Funktion in Neuronen zusprechen.

2.2.1 Das Hot Dog-Protein besitzt Sequenzähnlichkeit mit dem *C. elegans*-Protein F53B3.5

Die Analyse des Expressionsmusters des *hot*-Gens in *Drosophila*-Embryonen war nach meiner Diplomarbeit 2005 weitgehend abgeschlossen. Auch wurden in diesem

GENE ID: 180578 F53B3.5 F53B3.5 [Caenorhabditis elegans] (10 or fewer PubMed links)	
Score = 130 bits (328), Expect = 8e-29, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 85/265 (32%), Positives = 137/265 (51%), Gaps = 17/265 (6%)	
Query 2	PCSAVTLSIATICAIITALLAIAFSTDNWLHYDVWRNQI-QSFAAKHSDAESLLHNMNV 60
	PC LS A++ ++I L+ A +TDNW+ V R +I SF + + L +
Sbjct 21	PCH---LSCASVFLIGLGLVCFVAVTNDWVEVQVNRREIINSFKREPELSRLQNAFGH 77
Query 61	KYYYYTRTRGLFRICYPKERP-PVSAVPTYLSPIETHC--SNIDYFPQAEDEKIANEDAT 117
	Y++R GLF +C+P P V + SP C SN P+++ E +N +
Sbjct 78	NNIYFSRNYGLFNLCFPDTPVDVGSFSKMGSP----CIWSNEFMVPESKKEHFSNNELY 133
Query 118	SRLHLARSCIALFIISFVTIFCAFWTGLSGCWKRSSGAIATATSILLLVTCLLAAGAMGLW 177
	R + A++ I +++ V + +F GL GCW RS I +T ILL++ L + AM LW
Sbjct 134	-RHAAKATIIAYVVGIVFVLSFIVGLIGCWNRSKKFIMSTGILLILAGLSMSVAMLLW 192
Query 178	HTVEFFEKEKVVGEDYFQWNTVLRDNTKIAWDWSYIVAWAGIGTCLLASILLSGAAVCL 237
	H V + E+ + E Y++ W +L+ ++ Y WSYIV+W GIG ++ S + A +
Sbjct 193	HYVAYSERYTLDVEPYKSWEPILKLTSRHNYGWSYIVSWIGIGFIVIGSAFMFFAYAAV 252
Query 238	RNEREKEEQLNLQ---YLMPVYSQK 259
	+ RE+E+ L + Y+MP Y K
Sbjct 253	K--REEEDALTAKHGAYMMPNYYDK 275

Abb. 2.2.1.1 Ergebnis einer BLAST-Suche nach Hot Dog-Orthologen

Gezeigt ist der Sequenzvergleich nach einer BLAST-Suche von Hot („Query“) und F53B3.5 („Sbjct“). Zwischen den beiden Proteinen besteht eine Ähnlichkeit von 51%. F53B3.5 ist somit das Ortholog von Hot in *C. elegans*.

<p>GENE ID: 140723 Cacng5 calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5 [Mus musculus] (Over 10 PubMed links)</p>			
<p>Score = 48.1 bits (113), Expect = 0.001, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 60/249 (24%), Positives = 110/249 (44%), Gaps = 45/249 (18%)</p>			
Query	27	ASVFSLIGLGLVCFVTTDNWVEVQVNRREIINSFKREPELSLRLQNAFGHNNIYFSRNY	86
		+SVF++ GLGL+ AV+TD W+ ++ II + E+ + L +	
Sbjct	13	SSVFAVCGLGLLGIAVSTDYWLYLE---EGIILPQNQSTEVKMSLHS-----	56
Query	87	GLFNLCFPDTPVQDVGSFSKMGSPCIWSNEFMVPESKKEHFSNNELYRHYYAAKATIIAYV	146
		GL+ +CF ++ G ++ E+++P + + + AT +	
Sbjct	57	GLWRVCF--LAGEERGR-----CFTIEYVMPMNSQMTSESTVNVLMKIRSATPFP-L	105
Query	147	VGIVFVVLSTFIVGLIGCWNRSKKFIMS--TGILLILAGLSMSVAMLLWHYVAYSE--RYT	202
		V + F+ + FI+ IG R + I++ +GI IL+GLS+ V ++L+ E T	
Sbjct	106	VSLFFMFIGFILSNIG-HIRPHRTILAFVSGIFFILSGLSLVVGVLVLYISSINDEMLNRT	164
Query	203	LDVEPYKSWEPILKLTSRHNYGWSYIVSWIGIGFIVIGSAFMFFAYAAVKREEDALTA	262
		D E Y+ + YGWS+ ++ I F++ SA + Y +KR + +	
Sbjct	165	KDAETYFN-----YKYGWSF--AAAIISFLLTESAGVMSVYLFMKRYTAEDMYR	211

Abb. 2.2.1.2 Ergebnis einer BLAST-Suche nach F53B3.5-Orthologen

Gezeigt ist der Sequenzvergleich nach einer BLAST-Suche von F53B3.5 („Query“) und CACNG5 („Sbjct“). Zwischen den beiden Proteinen besteht eine Ähnlichkeit von 44%. F53B3.5 ist somit das Ortholog von *Mus musculus* CACNG5.

Rahmen Mutanten (*hot*⁹ und *hot*¹²) generiert und analysiert. In *hot*¹² mutanten Embryonen konnte ein schwacher, trachealer Phänotyp gefunden werden, der sich durch einen an den Metameren leicht eingeschnürten dorsalen Hauptstamm äußert. Um mehr Informationen über das Hot-Protein zu bekommen, führte ich im Rahmen dieser Arbeit Sequenzvergleiche durch. Ich fand neben konservierten Homologen unter Dipteren (nicht gezeigt) ein *C. elegans*-Ortholog namens F53B3.5. In Abb. 2.2.1.1 ist der Sequenzvergleich des Hot-Proteins mit F53B3.5 dargestellt. Es zeigte sich eine hohe Ähnlichkeit mit 51% von Hot zu F53B3.5. Dieses Protein ist seinerseits uncharakterisiert und es sind keine biologischen Daten verfügbar. Um das Ergebnis zu validieren, folgte eine reziproke BLAST-Suche. Hierbei suchte ich mit der F53B3.5-Sequenz und fand Hot als direktes Ortholog. Überraschenderweise stellte ich aber darüber hinaus fest, dass F53B3.5 ein Vertebraten-Ortholog mit 44% Ähnlichkeit besitzt (Abb. 2.2.1.2): CACNG5 (*Mus musculus*). Dieses Protein ist eine Calcium-Kanal Gamma Untereinheit und sehr ähnlich zu CACNG5 des Menschen. Der

wormbase-Eintrag von F53B3.5 beschreibt eine Ähnlichkeit zu humanem CACNG5 mit 43,7% (vergleiche <http://www.wormbase.org/db/gene/gene?name=WBGene00018743;class=Gene>). Es stellte sich nun die Frage, ob es sich bei Hot ebenfalls um eine Calcium-Kanal Gamma Untereinheit handeln könnte. Zwar fanden sich nach einer BLAST-Suche mit Standardparametern keine direkten Vertebratenhomologe (nicht gezeigt), aber die hohe Ähnlichkeit von Hot zu F53B3.5 ist so auffallend, dass ich diese Möglichkeit in Erwägung zog. Ebenfalls gilt zu beachten, dass bislang nur Vertebraten Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten beschrieben wurden. Validierte Invertebratenorthologe sind nicht bekannt. Beobachtungen an *hot*¹² mutanten adulten Fliegen lieferten erste Indizien dafür, dass Hot in Neuronen eine Funktion erfüllt.

2.2.2 Der *hot dog* mutante Phänotyp bei adulten Fliegen

Während meiner Diplomarbeit entdeckte ich einen schwachen Phänotyp im Tracheensystem von *hot* mutanten Embryonen. Dieser äußert sich durch leicht eingeschnürte Bereiche am trachealen, dorsalen Hauptast. Weitere frühe Phänotypen wurden nicht beobachtet. Beim Betrachten von adulten *hot* mutanten Fliegen fiel jedoch auf, dass diese sich *Dichaete*-ähnlich verhalten. *Dichaete*-Fliegen spreizen ihre Flügel im Winkel von etwa 45° ab und können diese nicht anlegen. *Dichaete* ist ein SOX-Domänen-Protein und *Dichaete*-Mutanten zeigen eine fehlerhafte Organisation der Axonenanordnung in Ganglien, die ihrerseits zu dichte, längslaufende Konnektive und partielle Fusionen von Kommissuren aufweisen. (Nambu PA. & Nambu JR., 1996; Russell SR. *et al.*, 1996). *hot*¹² mutante Fliegen winkeln im Gegensatz zu Kontrollfliegen ebenfalls ihre Flügel zu 45° ab (Abb. 2.2.2), sind aber noch in der Lage diese wieder anzulegen. Darüber hinaus zittern diese Fliegen mit den Flügeln mehrmals pro Sekunde während der Fortbewegung und während Ruhephasen (nicht gezeigt, Filmmaterial). Ein derartiges Zittern ist bei WT-Fliegen nicht zu beobachten. Um eine mögliche Hot-Funktion als Calcium-Kanal Gamma Untereinheit an Neuronen zu studieren, wurden elektrophysiologische Studien an der NMJ 6/7 von *Drosophila*-L3-Larven verschiedener Genotypen durchgeführt.

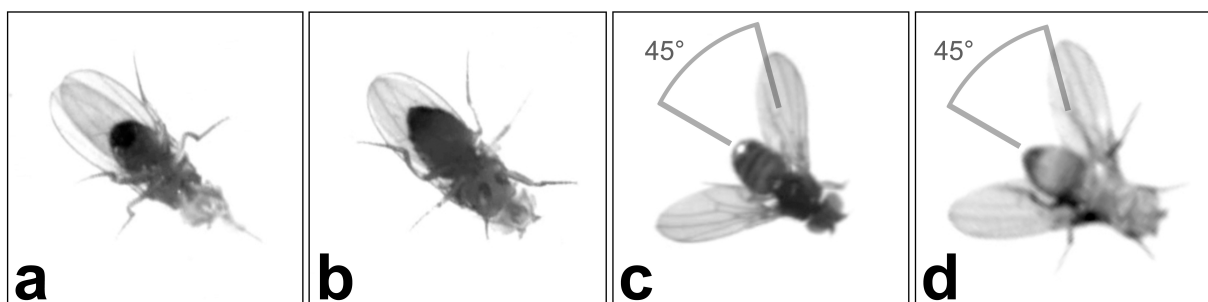


Abb. 2.2.2 Der Phänotyp bei *hot* mutanten adulten Fliegen

Dargestellt sind adulte *w*¹¹¹⁸-Fliegen (♂ in a und ♀ in b) sowie *hot*¹² mutante Fliegen (♂ in c und ♀ in d). *w*¹¹¹⁸-Fliegen, die das Hot-Protein exprimieren, legen während Ruhephasen die Flügel an. *hot*¹² mutante Fliegen dagegen spreizen die Flügel während Ruhephasen im Winkel von etwa 45° ab. Dorsale Aufsicht in a, b und d, ventrale Aufsicht in c.

2.2.3 two-electrode-voltage-clamp-Aufnahmen an neuromuskulären Verbindungen

Nachdem erste Hinweise auf eine Funktion des Hot-Proteins im Nervensystem als Calcium-Kanal γ Untereinheit vorlagen, wurden an L3-Kontrolllarven (GE23954) und *hot*¹²-L3-Larven elektrophysiologische *two-electrode-voltage-clamp*-Aufnahmen von an Nerven evozierten postsynaptischen Strömen durchgeführt (siehe Material und Methoden). Als Kontrolle diente eine von *hot*¹² unabhängige P-Element-Integrationslinie mit gleichem genetischen Hintergrund. *hot*¹² ist eine *hot*-Funktionsverlustmutante. Die Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Robert Kittel (European-Neuroscience-Institute in Göttingen) an der neuromuskulären Verbindung 6/7 (*neuromuscular junction*, NMJ) des ventral-longitudinalen Muskel 6 im Segment A2 oder A3 durchgeführt. Nach niederfrequenter Stimulation mit 0,2 Hz (Abb. 2.2.3.1 a) wurde für Kontrolllarven eine eEJC- (*evoked excitatory junctional current*-) Amplitude von $-70,4 \pm 3,6$ nA und für *hot*¹²-Larven eine eEJC-Amplitude von $-80,1 \pm 9,6$ nA gemessen. Hier zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Reizweiterleitung in *hot* mutanten Larven leicht, aber

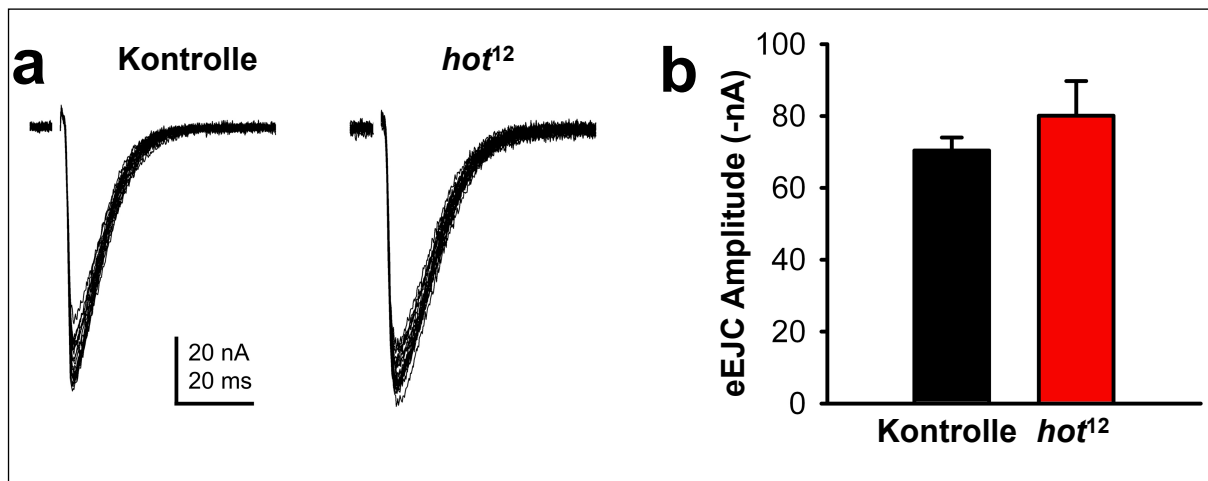


Abb. 2.2.3.1 Niederfrequenz-two-electrode-voltage-clamp-Aufnahmen

Dargestellt sind die gemessenen Ströme nach niederfrequenter Simulation (0,2 Hz) von NMJs an Kontrolllarven und *hot*¹² mutanten Larven. In (a) ist die Depolarisierung des Muskels (dort gemessener Strom: *evoked excitatory junctional current*, eEJC) nach Stimulation von kontroll-NMJs und *hot* mutanten NMJs übereinander projiziert. In (b) sind die gemessenen Werte aufgetragen und es zeigt sich in *hot* mutanten Larven (roter Balken) eine ähnliche Amplitude von $-80,1 \pm 9,6$ nA in Bezug zu den Kontrolllarven (schwarzer Balken, Amplitude: $-70,4 \pm 3,6$ nA).

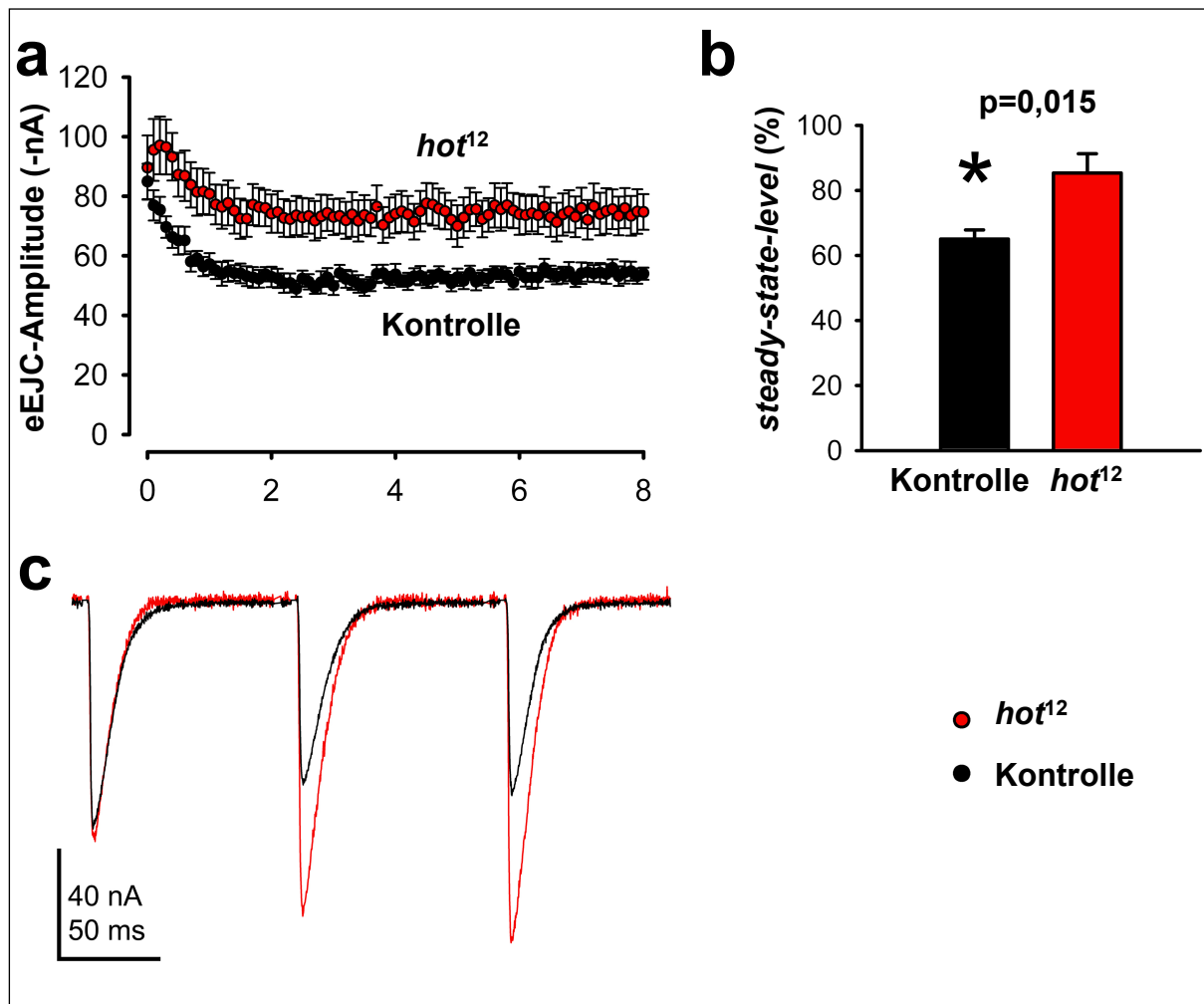


Abb. 2.2.3.2 Hochfrequenz-two-electrode-voltage-clamp-Aufnahmen

Dargestellt sind die gemessenen Ströme nach hochfrequenter Simulation (10 Hz) von NMJs an Kontrolllarven und *hot*¹² mutanten Larven. In (a) ist die Depolarisierung des Muskels (dort gemessener Strom: *evoked excitatory junctional current*, eEJC) nach Stimulation von kontroll-NMJs und *hot* mutanten NMJs gegen die Zeit aufgetragen. Es wird ersichtlich, dass bei der *hot*¹²-Mutante (rot) im Gegensatz zu der Kontrolle ein Anstieg des eEJC (Faszilitierung) zu Beginn der Stimulation und eine geringere Depression im weiteren Verlauf erfolgt. Der *steady-state-level* liegt im Weiteren höher als bei den Kontrolltieren (schwarz). Diese verhalten sich wildtypisch. In (b) sind die gemessenen Werte aufgetragen und es zeigt sich, dass in *hot* mutanten Larven (roter Balken, *steady-state-level*: 85,3 ± 5,9%) ein höherer *steady-state-level* verglichen mit der Kontrolle (schwarzer Balken *steady-state-level*: 65,1 ± 2,8%) auftritt. Die Werte wurden einem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test unterworfen (Sternchen). Dieser ergab eine Signifikanz von p=0,015. In (c) ist die initiale Faszilitierung des eEJC an *hot* mutanten Larven (rot) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) bei den ersten Messpunkten in einer höheren Auflösung zu erkennen. Deutlich wird das nach dem dritten elektrischen Puls der eEJC der *hot*¹²-Mutante doppelt so hoch ist wie der eEJC der Kontrolle.

nicht signifikant erhöht ist (Abb. 2.2.3.1 b). Wurden jedoch die Nerven im hochfrequenten Bereich bei 10 Hz stimuliert (Abb. 2.2.3.2 a), zeigte sich bei der *hot*¹²-Mutante im Gegensatz zu den Kontrolllarven ein Anstieg des eEJC (Faszilitierung) zu Beginn der Stimulation und nachfolgend eine geringere Depression. Der Rückgang des eEJC wird allgemein mit der Abnahme der verfügbaren Vesikel an der

Präsynapse erklärt (Schneggenburger R. *et al.*, 2002). Diese Depression kann aber auch mit einer Inaktivierung von Calcium-Kanälen zusammenhängen (Mochida S. *et al.*, 2008). Der *steady-state-level* von *hot* mutanten Larven liegt mit $85,3 \pm 5,9\%$ weitaus höher als bei den sich wildtypisch verhaltenden Kontrolltieren mit $65,1 \pm 2,8\%$ (Abb. 2.2.3.2 b). Die Werte wurden einem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test unterworfen (Sternchen in Abb. 2.2.3.2 b). Die Messergebnisse waren mit $p=0,015$ signifikant. Abb. 2.2.3.2 (c) zeigt hochaufgelöst die initiale Faszilitierung des eEJC an *hot* mutanten Larven (rot) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz). Während bei den Kontrolllarven ab dem zweiten elektrischen Puls eine Depression des eEJCs erfolgt, konnte bei *hot*¹²-Larven eine deutliche Faszilitierung beobachtet werden, so dass nach dem dritten Puls der eEJC der *hot*¹²-Mutante doppelt so hoch war wie der eEJC der Kontrolle. Offenbar werden in den mutanten NMJs noch nicht ausgelöste Vesikel rekrutiert und exozytiert. Dieser Vorgang könnte durch einen verstärkten Calcium-Ionen-Einstrom in die Präsynapse hervorgerufen und durch das Fehlen einer inhibitorisch einwirkenden Komponente an Calcium-Kanälen erklärt werden (Mochida S. *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Hot Dog als Calcium-Kanal Gamma Untereinheit inhibitorisch Calcium-Kanäle in *Drosophila*-NMJs modulieren könnte.

2.2.4 Hot Dog ist an der neuromuskulären Verbindung von *Drosophila*-L3-Larven lokalisiert

Ich habe Hinweise vorgestellt, die dem claudinähnlichen Transmembranprotein Hot eine Funktion an der NMJ in *Drosophila*-Larven zusprechen. Um das Protein nachzuweisen, führte ich anti-Bruchpilot- und anti-Hot-Antikörperfärbungen an NMJs von WT-L3-Larven und *hot*¹² mutanten L3-Larven durch. Bruchpilot ist ein essenzieller Bestandteil der präsynaptischen aktiven Zone (Kittel R. *et al.*, 2006) und kann als Marker der NMJs verwendet werden. In WT-Larven erschien das Bruchpilot-Protein in einem punktartigen Muster an der NMJ (Abb. 2.2.4 a und d, Pfeilspitze in Abb. 2.2.4 c und f). Das Hot-Protein war ebenfalls in einem solchen

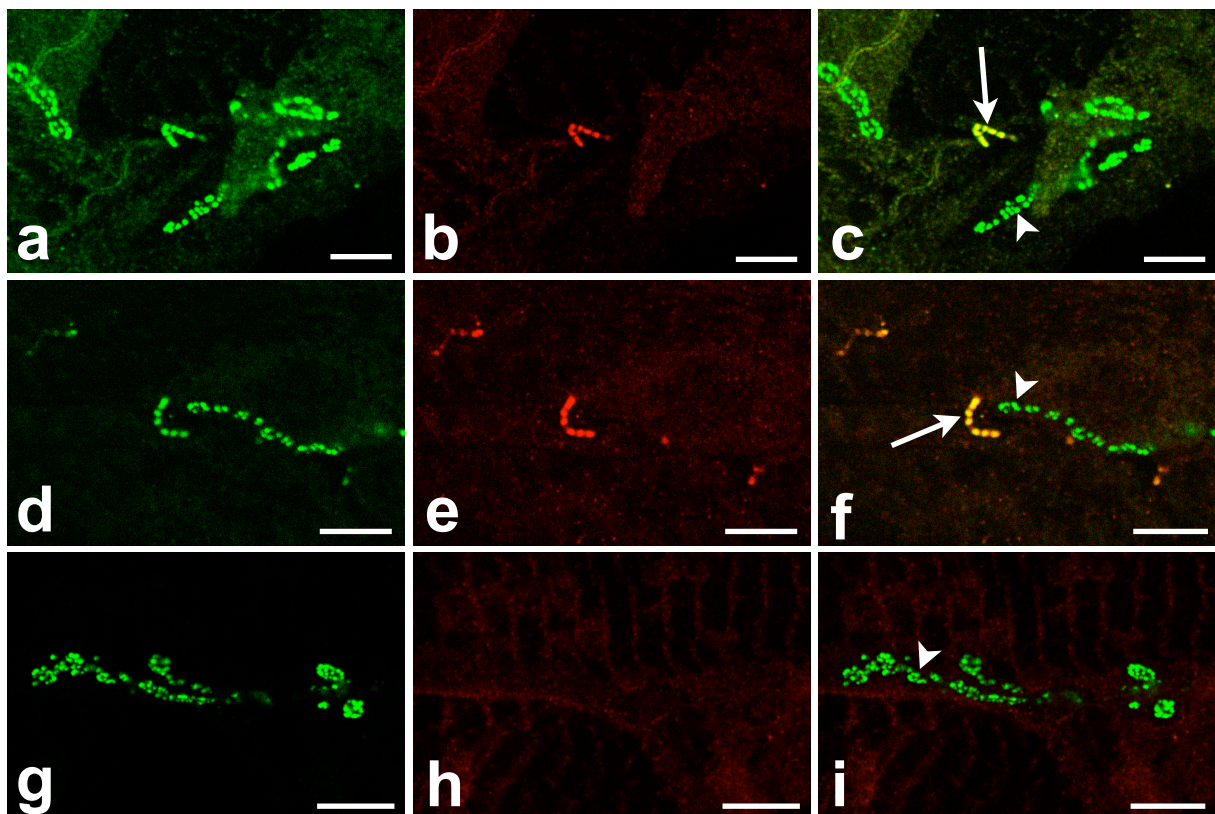


Abb. 2.2.4 Die Lokalisierung von Hot Dog in *Drosophila*-L3-Larven

Dargestellt sind anti-Bruchpilot- und anti-Hot Dog-Antikörperfärbungen an NMJs von WT-L3-Larven (a-f) und *hot* mutanten L3-Larven (g-i). Zu erkennen ist das anti-Bruchpilot-Signal (grün, Pfeilspitze in c und f) sowie das anti-Hot-Signal (rot, Pfeil in c und f). Interessanterweise zeigt sich keine generelle, sondern nur eine partielle Kolo-kalisierung der beiden Proteine an der NMJ. In *hot* mutanten L3-Larven ist kein Hot-Signal festzustellen, sondern nur das anti-Bruchpilot-Signal (Pfeilspitze in i) was die Spezifität des Antikörpers nachweist. Anterior ist links und dorsal ist oben. Die weißen Balken entsprechen 10µm.

punktartigen Muster an der NMJ zu erkennen und kolokalisiert mit Bruchpilot (Abb. 2.2.4 b und e, Pfeil in Abb. 2.2.4 c und f). Interessanterweise war diese Kolokalisierung mit Bruchpilot nicht kontinuierlich, sondern nur in bestimmten Bereichen zu beobachten. Dies ist ein weiterer Hinweis für eine Funktion von Hot an Motorneuronen und liefert auch Evidenzen für spezialisierte Sub-Zonen der NMJs mit einer unterschiedlichen molekularen Zusammensetzung. Um auszuschließen, dass das Hot-Signal auf Hintergrundfärbung zurückzuführen ist, färbte ich *hot* mutante L3-Larven mit anti-Bruchpilot- und anti-Hot-Antikörpern an. In diesen *hot*-Funktionsverlustmutanten war nur das Bruchpilot-Protein in einem punktartigen Muster zu erkennen (Abb. 2.2.4 g, Pfeilspitze in Abb. 2.2.4 i), aber nicht das Hot-Protein (Abb. 2.2.4 h und i). Somit zeigte sich, dass Hot an der NMJ zusammen mit dem Bruchpilot-Protein zu finden ist, das seinerseits für die korrekte Lokalisation von Calcium-Kanälen verantwortlich ist (Kittel R. *et al.*, 2006). Hot Dog könnte also eine Calcium-Kanal Gamma Untereinheit sein (2.2.1), die mit Calcium-Kanälen lokalisiert (2.2.4) und auf diese inhibitorisch einwirkt (2.2.3).

3 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten wurden zum Zweck des manipulativen Eingriffs in Genfunktionen verschiedene Methoden bei *Drosophila melanogaster* entwickelt. So ist es möglich, mit dem GAL4/UAS-System Transgene in verschiedenen Zellen und Geweben zu exprimieren (Brand AH. & Perrimon N., 1993; Duffy JB., 2002). RNA-Interferenz ist dagegen eine Methode Genfunktionen auszuschalten, indem die mRNA-Konzentration in Zellen gezielt reduziert wird (Kennerdell JR. & Carthew RW., 2000; Dietzl G. *et al.*, 2007). Die Mosaik-Analyse ermöglicht die Erzeugung einzelner mutanter Zellen oder Zellgruppen und die Beobachtung von Phänotypen in entsprechenden Geweben (Xu T. & Rubin GM., 1993). Diese gängigen Ansätze manipulieren jedoch lediglich die Gen-Transkription. Die Funktion von Proteinen, die bereits synthetisiert oder maternal im Embryo abgelegt wurden, sind mit diesen Methoden nicht veränderbar. Daher ist es bisher nicht möglich gewesen, einzelne Proteindomänen unabhängig voneinander *in vivo* zu untersuchen. Auch war die Analyse einzelner Komponenten in ganzen Proteinkomplexen schwierig. Das in dieser Arbeit analysierte Transmembranprotein Megatrachea (Mega; Behr M. *et al.*, 2003) konnte in der Vergangenheit mit den bisher verfügbaren Methoden ebenfalls nicht detailliert untersucht werden. Dies liegt darin begründet, dass der intrazelluläre Mega-C-Terminus essenziell für die Inkorporation des Mega-Proteins in die Zellmembran ist und ein um den C-Terminus verkürztes Protein nicht korrekt exprimiert wird (Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Nur durch eine von mir neu etablierte Methode zur posttranslationalen Modifizierung ist ein *in vivo* Einblick in die Funktionsweise der C-terminalen Domäne von Mega und die Unterscheidung dieser Funktion vom Gesamtprotein möglich geworden. Durch diese Methode wurden auch molekulare Zusammenhänge sichtbar, die bislang unbekannt waren.

3.1 *in vivo* Manipulation von Proteinen durch das TEV-Protease-System

Im Zentrum der von mir etablierten neuen Methode bei *Drosophila melanogaster* steht die *tobacco-etch-virus*- (TEV-) Protease als Werkzeug. Dieses Enzym wird schon seit geraumer Zeit *in vitro* verwendet, um an Affinitätssäulen gebundene Proteine abzuspalten. Ein wichtiges Charakteristikum ist die spezifische Erkennungssequenz (ENLYFQ*S/G), die von diesem Enzym geschnitten wird. Abweichungen von dieser Sequenz führen zu einer starken Verminderung der Spaltungseffizienz (Dougherty WG. *et al.*, 1989; Kapust RB. *et al.*, 2002). Somit würde die denkbare Prozessierung von endogenen *Drosophila*-Proteinen mit ähnlichen Sequenzabschnitten (*off-targets*), wenn durch sterische Hinderung überhaupt möglich, nur sehr ineffizient ablaufen.

Um erste Eindrücke bezüglich der Nutzbarkeit dieses Enzyms in *Drosophila* zu bekommen, führte ich Tests mit kultivierten *Drosophila*-Zellen durch. Hierfür modifizierte ich das dTao-Protein, das sich durch eine Zytoplasmalokalisation und eine Exklusion aus dem Zellkern in *Drosophila*-Zellen auszeichnet (Strange K. *et al.*, 2005; Pflanz R., unpublizierte Ergebnisse). Der N-terminale dTao-Abschnitt wurde mit einem YFP (*yellow fluorescent protein*; Nagai T. *et al.*, 2002) versehen und durch eine TEV-Schnittstelle vom C-terminalen dTao-Abschnitt abgegrenzt. Zunächst konnte ich durch Antikörperfärbungen zeigen, dass das dTao-Fusionsprotein im Zytoplasma, aber nicht im Nukleus zu finden ist. Exprimierten die Zellen neben dem Fusionsprotein zusätzlich die TEV-Protease, konnte ich feststellen, dass der mit dem YFP assoziierte N-terminale Abschnitt von dTao ektopisch in den Zellkern gelangte (2.1.1). Offensichtlich wurde der dTao-C-Terminus abgespalten. Dies ist ein wesentliches Indiz für die enzymatische Aktivität der TEV-Protease im Zytoplasma der betrachteten Zellen. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine zusätzliche Lokalisierung der TEV-Protease ihrerseits im Nukleus festgestellt werden. Die beobachteten Zellen waren stets vital und teilungsfähig. Daher besteht Anlass anzunehmen, dass die TEV-Protease nicht toxisch auf Zellstrukturen einwirkt.

Zur Studie der katalytischen Effizienz der TEV-Protease benutzte ich, ebenfalls in *Drosophila*-Zellkultur, ein Fusionsprotein, das aus dem Membrananker CD8 (Devine L. *et al.*, 1999), einem EGFP (*green fluorescent protein*; Tsien RY., 1998) und einem RFP (mCherry, *red fluorescent protein*; Shaner NC. *et al.*, 2005) besteht. Das mCherry ist mit einer Kernlokalisationssequenz versehen und durch eine TEV-Protease-Schnittstelle vom EGFP abgegrenzt. Ich testete die Effizienz mit der die TEV-Protease ihr Substrat in lebenden Zellen prozessiert. Hierzu induzierte ich die TEV-Protease-Expression in diesen Zellen mittels Zugabe von Kupfersulfat und stellte vier Stunden später eine Akkumulation des mCherry im Nukleus fest (2.1.2). Dies zeigte, dass die Spaltung des Fusionsproteins stattfand. Es ist bekannt, dass die Expression von Enzymen in Zellen unterschiedlich lange dauert. Da nach vier Stunden ein deutliches mCherry-Signal im Zellkern zu erkennen war, lässt sich daraus ableiten, dass katalytisch aktive TEV-Protease in diesem Zeitraum gebildet wurde und das Substrat nachweislich prozessierte. Es zeigte sich somit, dass die Expression der TEV-Protease in *Drosophila*-Zellkultur Zielproteine an spezifischen Schnittstellen effizient spalten kann. Die Experimente gestalteten sich aber insgesamt als schwierig, da sich nicht jede Zelle mit der gleichen Menge DNA kotransfizieren ließ und somit auch die Proteinmengen schwankten. Die Zielsetzung dieser Zellkulturexperimente war jedoch nicht die Bestimmung der Kinetik der TEV-Protease, sondern vielmehr die Überprüfung der katalytischen Aktivität in einem einfach durchzuführenden Versuchsansatz. Nun stellte sich die Frage, wie sich die Expression der TEV-Protease auf die Entwicklung der Fliegen auswirkt. Statistisch betrachtet ist es möglich, dass *off-targets* im *Drosophila*-Proteom vorkommen. Dies könnte für die Anwendbarkeit der TEV-Protease in der Fliege ein Hindernis darstellen. Diese *off-targets* lassen sich mit computergestützten Analysen vorhersagen, aber nicht ob sie für die TEV-Protease zugänglich sind. Um der Frage nachzugehen, ob essenzielle, endogene Proteine durch die TEV-Protease geschnitten werden, führte ich unterschiedliche Kreuzungsexperimente durch, bei denen die TEV-Protease in diversen *Drosophila*-Geweben exprimiert wurde.

Die TEV-Protease wurde durch das GAL4/UAS-System (Brand AH. & Perrimon N., 1993; Duffy JB., 2002) in verschiedenen Fliegengeweben und auch ubiquitär exprimiert. Ich verwendete den Flügelmarker *Curly*, um jene Fliegen, die keine TEV-Protease-Expression aufweisen, zu markieren. Das Chromosom, das die dominante Mutation *Curly* trägt, besitzt einige genomische Inversionen, um als *balancer* dienen zu können. Dadurch wird eine reduzierte Lebensfähigkeit gegenüber Fliegen verursacht, die dieses Chromosom nicht besitzen und keine TEV-Protease exprimieren (2.1.3). Das Verhältnis der geschlüpften Fliegen entspricht daher zwischen den verschiedenen Genotypen nicht der Mendelschen Verteilung. Interessanterweise zeigt sich eine nur minimal reduzierte Vitalität bei Fliegen, die TEV-Protease im Tracheensystem oder im Hinterdarm, Vorderdarm und Speicheldrüse exprimieren. Offenbar stört die Überexpression nicht die Entwicklung dieser lebenswichtigen Organe. Erfolgt die Expression der TEV-Protease in allen Zellen des Organismus, so ist die Lebensfähigkeit von *Drosophila* stärker reduziert. Dieses Phänomen tritt mit zwei unabhängigen ubiquitären GAL4-Treibern (*tubulin*-GAL4 und *actin*-GAL4) auf. Betrachtet man den Sachverhalt nach ubiquitärer Expression der *E. coli* β -Galactosidase (LacZ), so wird deutlich, dass die Reduktion offenbar nicht auf die Aktivität der TEV-Protease zurückzuführen ist. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die ubiquitär unphysiologisch verteilten hohen Proteinkonzentrationen von GAL4 und TEV-Protease bzw. LacZ diesen Effekt verursachen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die TEV-Protease in diesen Fliegen keine für die Lebensfähigkeit wichtigen *off-targets* prozessiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach TEV-Protease-Expression lebensfähige und fertile Fliegen schlüpften und so weiterführende Analysen durch die Nutzung der TEV-Protease in lebenden Fliegen möglich waren.

In Zellkulturexperimenten konnte ich feststellen, dass sich das dTao-Fusionsprotein durch die TEV-Protease schneiden und sich dadurch eine ektopische nukleäre Lokalisation eines N-terminalen dTao-Abschnitts erreichen lässt. Nun

führte ich dieses Experiment im multizellulären Organismus durch, um zu testen, ob die TEV-Protease auch in *Drosophila*-Embryonen aktiv ist. Das dTao-Fusionsprotein wurde erfolgreich in trachealen Zellen exprimiert. Hierbei zeigte sich eine nukleäre Exklusion des Proteins. Wurde jedoch zusätzlich die TEV-Protease exprimiert, erschien das YFP (Nagai T. *et al.*, 2002) im Zellkern angereichert. Hier bestätigten sich die Erkenntnisse aus den Zellkulturexperimenten, die zeigten, dass die TEV-Protease effizient die C-terminale Zytoplasmalokalisationsdomäne abspalten kann. Da die bisherigen Versuche auf ektopisch überexprimierten Proteinen basieren, versuchte ich ein *Drosophila*-Protein unter endogener Expressionshöhe durch die TEV-Protease zu modifizieren. Hierzu generierte ich das Konstrukt für ein Mega-Fusionsprotein, das am C-Terminus über eine TEV-Schnittstelle mit einem YFP fusioniert ist. Dieses Konstrukt war in der Lage, den *mega* mutanten Phänotyp zu revertieren. Antikörperfärbungen zeigten, dass das Fusionsprotein in den *septate junctions* (SJs) der Epidermis, des Hinterdarms, der Speicheldrüsen und des Tracheensystems wildtypisch lokalisiert ist. Nach TEV-Protease-Expression ging das SJs-spezifische YFP-Signal verloren und erschien in den Zellen verteilt. Dies ist ein Beweis für die erfolgreiche Prozessierung des Mega-Fusionsproteins an der TEV-Protease-Schnittstelle. Ergänzend konnte ich in lebenden *Drosophila*-Embryonen das Mega-Fusionsprotein zeit- und ortspezifisch schneiden. Dies zeigt die Möglichkeit, verschiedene Proteine oder Proteinabschnitte zu einem bestimmten Zeitpunkt oder in bestimmten Geweben in ihrer Funktion zu analysieren. So konnte mit diesem Experiment zum ersten Mal die Orientierung von Mega in der Membran nachgewiesen werden. Bisherige Modelle stützten sich lediglich auf bioinformatische Vorhersagen (Behr M. *et al.*, 2003). Die für dieses Experiment verwendete TEV-Protease war zytosolisch lokalisiert und daher konnte der Mega-C-Terminus nur dann gespalten werden, wenn sich dieser ebenfalls im Zytosol befand. Es ist nun möglich, auch die Orientierung anderer Proteine in verschiedenen Zellkompartimenten *in vivo* mit dem TEV-Protease-System zu untersuchen. Weiterhin konnte ich zeigen, dass die TEV-Protease sehr dicht an der Zellmembran

Zielpoteine schneiden kann. Dies ist nicht selbstverständlich, da Mega möglicherweise in große Proteinkomplexe inkorporiert wird und dieser Umstand eine sterische Behinderung für die TEV-Protease darstellen könnte. Offenbar überwindet die TEV-Protease aber solche Hindernisse und kann für Studien von verschiedenen Proteinkomplexen effizient eingesetzt werden. An dieser Stelle war das TEV-Protease-System so weit entwickelt, dass nun Analysen der C-terminalen Domäne von Mega durchführbar waren. Ich möchte im Folgenden nun ausführen, welche Erkenntnisse mittels dieser Methode gewonnen werden konnten.

Es zeigte sich, dass es nicht möglich ist, mit den gängigen Methoden die Funktion des C-Terminus des Mega-Proteins in *Drosophila* zu studieren, weil der Mega-C-Terminus für die Inkorporation von Mega in die Zellmembran benötigt wird (Gerlach N., Dissertation Braunschweig 2006). Ich generierte das Konstrukt für ein Mega-Fusionsprotein (Mega-TEVpcs-CTerm) bei dem der intrazelluläre C-Terminus durch eine TEV-Schnittstelle von der N-terminalen Sequenz abgegrenzt ist. *mega*-Mutanten, die das dafür codierende Transgen besitzen sind lebensfähig, fertil und bilden im Gegensatz zur nicht geretteten *mega*-Mutante ein normales Tracheensystem aus (2.1.7). Antikörperfärbungen mit einem anti-Mega-C-Terminus-Antikörper zeigten, dass dieses Fusionsprotein korrekt in die SJs inkorporiert wird. Nach Expression der TEV-Protease im Tracheensystem konnte der Mega-C-Terminus dort nicht mehr nachgewiesen werden, war aber weiterhin in der Epidermis und im Hinterdarm in den SJs lokalisiert. Darüber hinaus kam es zu *mega*-Phänokopien, die sich im Auftreten eines elongierten, abnormalen Tracheensystems mit formverzerren Tracheenzellen äußerten. Diese Beobachtungen sind durch das TEV-Protease-vermittelte Abspalten des Mega-C-Terminus (Mega-ΔCTerm) zu erklären und verdeutlichen, dass sich mit der Expression der TEV-Protease Proteine gezielt in ihrer Funktion stören lassen. Ich erwartete, dass der abgespaltene Mega-C-Terminus, genau wie YFP (s. o.), in den Zellen verteilt nachzuweisen ist. Interessanterweise konnte aber, im Gegensatz zu YFP, der abgespaltene Mega-C-Terminus nicht mehr

mit dem anti-Mega-C-Terminus-Antikörper im Tracheensystem detektiert werden. Hierfür könnte zum Beispiel eine schnelle Degradation des Mega-C-Terminus durch das Proteasom nach Abspaltung verantwortlich sein. Denkbar ist aber auch, dass der anti-Mega-C-Terminus-Antikörper aufgrund sterischer Änderungen durch den abgetrennten Mega-C-Terminus nicht mehr in der Lage ist, diesen zu detektieren.

Der *mega* mutante Phänotyp ist neben embryonaler Letalität, elongiertem Tracheensystem und der gestörten transepithelialen Barriere auch durch den Verlust der SJs gekennzeichnet (Behr M. *et al.*, 2003; Wu V. *et al.*, 2004). TEV-Protease-vermittelte *mega*-Phänokopien legen nahe, dass ebenfalls die Integrität der SJs betroffen ist. Um dies festzustellen, wurden Antikörperfärbungen mit den SJs-Markern Fasciclin III (Woods DF *et al.*, 1997) und Coracle (Fehon RG. *et al.*, 1994) durchgeführt. In *mega* mutanten Embryonen waren diese Marker im Gegensatz zu WT-Embryonen entlang der basolateralen Membran misslokalisiert (2.1.8). Dies ist ein Indiz für den Verlust der SJs (Behr M. *et al.*, 2003). Mega-TEVpcs-CTerm führte zu einer wildtypischen Lokalisation dieser SJs-Bestandteile. Erstaunlicherweise kam es nach Induktion der *mega*-Phänokopien, also nach Abspalten des Mega-C-Terminus durch die TEV-Protease, im Unterschied zu *mega*-Mutanten nicht zur Misslokalisierung der Marker Fasciclin III und Coracle. Offensichtlich wurden die SJs durch diese leichte Modifikation nicht derart gestört, dass eine ektopische Verteilung dieser SJs-Bestandteile auftrat. Ich prüfte auch die korrekte Membraninkorporation von Mega-TEVpcs-CTerm mit einem anti-Mega-N-Terminus- und mit einem anti-Mega-C-Terminus-Antikörper. Dieses Experiment zeigte, dass das Mega-Fusionsprotein in die SJs eingebaut wird, der Mega-C-Terminus nach TEV-Protease-Expression fehlt und der N-Terminus in den modifizierten SJs verbleibt. Die wenigen schwachen Mega-C-Terminus-Signale in den SJs werden wahrscheinlich durch nicht vollständig gespaltenes Mega-TEVpcs-CTerm hervorgerufen. Offenbar war nicht in jeder Zelle die gleiche TEV-Protease-Aktivität vorhanden. Dies kann durch das GAL4/UAS-System bedingt sein, da dieses eine ungleichförmige GAL4-Expression

vermittelt (Kühnlein RP. & Schuh R., 1996). Folglich könnte dies auch eine ungleichförmige TEV-Protease-Expression in unterschiedlichen Tracheenzellen hervorrufen. *mega*-Phänokopien sind also nicht auf ein Fehlen des gesamten Mega-Fusionsproteins nach TEV-Protease-Expression, sondern auf die TEV-Protease-vermittelte Spaltung des Mega-C-Terminus zurückzuführen.

Zur weiteren Untersuchung der *mega*-Phänokopien, bin ich der Frage nachgegangen, ob es ebenfalls wie bei *mega*-Mutanten zu einem Verlust der von SJs abhängigen transepithelialen Barriere kommt (Behr M. *et al.*, 2003; Wu V. *et al.*, 2004). Ich prüfte die *barrier function* nach TEV-Protease-vermittelter Katalyse des Mega-C-Terminus durch Mikroinjektionsexperimente. Nach der Injektion eines mit Texas-Red markierten Dextrans in lebende *Drosophila*-Embryonen (2.1.9), konnte der Farbstoff bei WT-Embryonen auch nach 60 Minuten die tracheale Zellbarriere nicht überwinden. Dagegen wurde in *mega* mutanten Embryonen nach dieser Zeit eine Akkumulation des Dextrans im Lumen der Tracheen festgestellt. Nach Mikroinjektion des Farbstoffes in Mega- Δ Cterm-Embryonen, die ebenfalls wie *mega* mutante Embryonen ein elongiertes Tracheensystem aufwiesen, zeigte sich nach 60 Minuten WT-ähnlich keine Passage des Texas-Red-Dextrans durch das Tracheenepithel in das Tracheenlumen. Dies verdeutlicht, dass nach TEV-Protease-vermittelter trachealer Phänokopie der *mega*-Mutante die *barrier function* nicht defekt ist. Elongierte mutante Tracheenäste sind daher nicht auf eine fehlende transepitheliale Barriere zurückzuführen, da diese nicht gestört ist. Somit konnte ich zeigen, dass die transepitheliale Barriere und die Ausbildung einer normalen Tracheenmorphologie zwei voneinander unabhängige, trennbare Funktionen der SJs sind.

Es stellte sich weiterführend die Frage, wie die trachealen *mega*-Phänokopien entstehen. Neben *mega* gibt es noch weitere Gene, die für die korrekte Ausbildung des Tracheensystems in *Drosophila* notwendig sind. Dazu gehören ein zweites

Claudingen *sinuous* (*sinu*; Wu V. *et al.*, 2004) und die Gene *serpentine* (*serp*) und *vermiform* (*verm*) (Luschnig S. *et al.*, 2006). Die Genprodukte von *serp* und *verm* sind Chitin-Deacetylasen und für die korrekte Ausbildung eines Chitinfilaments innerhalb des Tracheenlumens notwendig (Tonning A. *et al.*, 2005), indem sie Chitin zu Chitosan deacetylieren (Luschnig S. *et al.*, 2006). Für *sinu*-Mutanten wurde beschrieben, dass Verm nicht korrekt in das Tracheenlumen sezerniert wird. Dadurch wird eine Missorganisation des im Tracheenlumen lokalisierten Chitinfilaments und damit die Elongation des Tracheensystems hervorgerufen (Wang S. *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass dieser Vorgang mit der Zerstörung der SJs bei *sinu*-Mutanten zusammenhängt (Wang S. *et al.*, 2006). Ich färbte zunächst in *mega* mutanten Embryonen Chitin an und beobachtete, im Gegensatz zu WT-Embryonen, ein verändertes Chitinfilament analog zu *sinu*-, *serp*- und *verm*-Mutanten. Dann untersuchte ich Mega-TEVpcs-Cterm-Embryonen und fand ein wildtypisches Chitinfilament vor. In Mega-ΔCterm-Embryonen, in welchen die SJs-Marker Fasciclin III sowie Coracle korrekt lokalisiert sind und die transepitheliale Barriere nicht verändert ist (2.1.8), äußert sich die *mega*-Phänokopie ebenfalls in einem aberranten Chitinfilament analog zu *sinu*-, *serp*- und *verm*-Mutanten. Dies war ein erstaunliches Ergebnis, da nun offensichtlich wird, dass nur durch eine leichte Modifizierung der SJs, durch das Abspalten des Mega-C-Terminus, die wildtypische Ausbildung des Filaments verhindert wurde. In *sinu*-Mutanten ist Mega misslokalisiert (Küstner K., unpubliziert) und damit auch der Mega-C-Terminus. Dies führt zu einer Störung der mit dem Mega-C-Terminus assoziierten Funktionen. Der tracheale Phänotyp von *sinu* und *mega* mutanten Embryonen könnte so erklärt werden: Die Misslokalisierung bzw. der Verlust des Mega-C-Terminus führt zu einem aberranten Chitinfilament. Dies bewirkt eine Vergrößerung des apikalen Bereichs des Tracheenepithels. Als Folge entsteht ein verlängertes, elongiertes Tracheensystem. Da die Zellzahl im Tracheenepithel immer gleich bleibt, werden die Zellen zwangsweise auf der vergrößerten Oberfläche des Lumens gestreckt. Die Elongation des

Tracheensystems und die Verzerrung der trachealen Zellen sind also sekundäre Effekte und eine Folge des aberranten Chitinfilaments.

Im Folgenden ging ich der Frage nach, welche molekularen Ursachen für das aberrante Chitinfilament in Mega- Δ Cterm-Embryonen verantwortlich sein könnten. Es wurde gezeigt, dass die Chitin-Deacetylasen Serp und Verm für die wildtypische Entwicklung des Tracheensystems bei *Drosophila*-Embryonen notwendig sind. Fehlen diese Enzyme, so bildet sich ein im Tracheenlumen liegendes Chitinfilament fehlerhaft aus, und es kommt zu elongierten Tracheenästen (Tonning A. *et al.*, 2005; Luschnig S. *et al.*, 2006). Dieser Phänotyp wurde ebenfalls für *mega*- und *sinu*-Mutanten beschrieben. Es zeigte sich weiter, dass in *sinu* mutanten Embryonen Verm nicht in das Tracheenlumen sezerniert wird, sondern in den Tracheenzellen verbleibt. Dies wird durch eine fehlerhafte Exozytose, die durch zerstörte SJs hervorgerufen wird, erklärt (Wang S. *et al.*, 2006). Zur Untersuchung des *mega* mutanten trachealen Phänotyps und der TEV-Protease-vermittelten *mega*-Phänokopien führte ich anti-Serp- und anti-Verm-Antikörperfärbungen durch. Die Sekretion von Serp und Verm wurde in *mega*-Mutanten bisher nicht analysiert. Für das Verständnis des *mega* mutanten trachealen Phänotyps und der *mega*-Phänokopien waren diese Untersuchungen sehr wichtig, da die Exozytose von Serp und Verm ins Tracheenlumen ebenfalls gestört sein könnte. So zeigten *mega* mutante Embryonen im Unterschied zu WT-Embryonen keine Lokalisation von Serp und Verm im Tracheenlumen, aber apikal in den Tracheenzellen. Dieses Ergebnis entspricht dem *sinu* mutanten Phänotyp (Wu V. *et al.*, 2004). Weiterhin zeigten Mega-TEVpcs-Cterm-Embryonen eine wildtypische Anreicherung von Serp und Verm im Tracheenlumen. Das bedeutet, dass die Exozytose in solchen Embryonen normal funktioniert. Erstaunlicherweise jedoch zeigten Mega- Δ Cterm-Embryonen wiederum eine gestörte Exozytose von Serp und Verm. In diesen Embryonen sind die SJs durch das Abspalten des Mega-C-Terminus modifiziert. Somit reicht alleine das Entfernen des Mega-C-Terminus aus, um den Transport von Serp und Verm in das Tracheenlumen

zu stören. Dieser Sachverhalt zeigt, dass der Mega-C-Terminus in den SJs essenziell für die korrekte Sekretion von Serp und Verm ist. Mit diesem Befund lässt sich auch das aberrante Chitinfilament in Mega- Δ C-Term-Embryonen erklären, da die benötigten Enzyme für eine korrekte Ausbildung des Filaments nicht richtig transportiert und lokalisiert werden. Es offenbart sich, dass den trachealen *mega*-Phänokopien die gestörte Exozytose durch das TEV-Protease-vermittelte Abspalten des Mega-C-Terminus zugrunde liegt. Während Mega für den Aufbau und Erhalt der SJs essenziell ist und *mega*-Funktionsverlust zur Zerstörung der SJs sowie der *barrier function* führt, konnte ich dem Mega-C-Terminus die Funktion der Aufrechterhaltung der Exozytose von Serp und Verm in trachealen Zellen zuordnen. Die Exozytose dieser Proteine bewirkt die wildtypische Ausbildung des Chitinfilaments, die Kontrolle der Tracheengröße sowie der Tracheenzellform. Die TEV-Protease-vermittelten *mega*-Phänokopien sind diesbezüglich genauso stark wie *mega*-Funktionsverlustmutationen. Durch das TEV-Protease-System konnte somit zum ersten Mal die *in vivo* Funktion des Mega-C-Terminus von der Gesamtfunktion des Mega-Proteins getrennt werden.

Mit diesen Ergebnissen wurde das Verständnis der molekularen Zusammenhänge der Entwicklung des Tracheensystems in *Drosophila*-Embryonen maßgeblich erweitert. Dies war nur durch die Verwendung des während dieser Arbeit entwickelten TEV-Protease-Systems möglich. Hier zeigt sich das Potenzial dieser von mir etablierten Methode. Es ist ein neues Werkzeug entwickelt worden, um biologische Zusammenhänge aufzuklären, die mit bisher verfügbaren Methoden unzugänglich waren. Nun sind noch viele weitere Experimente denkbar, mit denen das Mega-Protein mit der TEV-Protease untersucht werden kann. Da es mir gelang die Funktion des Mega-C-Terminus von der Mega-Gesamtfunktion zu trennen, ist es denkbar, auch andere Mega-Domänen mit der TEV-Protease zu schneiden, um verschiedene Mega-Funktionen zu dissektieren. So ist eine *in vivo* Spaltung der extrazellulären Bereiche mit der vorgestellten, dafür etablierten sezernierten TEV-

Protease (2.1.12) geplant. Diese wurde schon erfolgreich in *Drosophila*-Embryonen getestet und konnte dort in extrazellulären Bereichen nachgewiesen werden. Hiermit könnte ein Einblick in die Etablierung der transepithelialen Barriere, des Aufbaus der SJs und der dabei involvierten Proteinkomplexe möglich werden. Das TEV-Protease-System kann darüber hinaus aber auch zur Erforschung der Zellkommunikation, des Zytoskeletts, dem *genomic imprinting* oder auch der Zelladhäsion dienen. So ist es denkbar, Liganden während der Zellkommunikation mit der sezernierten TEV-Protease zu einem bestimmten Zeitpunkt zu inaktivieren. Das würde Licht auf die Frage werfen, wann welche Art der Kommunikation bei Zelldifferenzierungen wichtig ist. Auch ist geplant, die für die Tracheenentwicklung essenzielle FGF-Signaltransduktionskaskade mit dem TEV-Protease-System zu verschiedenen Zeitpunkten am FGF-Rezeptor zu stören. Durch das gezielte, TEV-Protease-vermittelte Abspalten der Kinasedomäne von Breathless, also durch die Inaktivierung des Rezeptors, ließen sich auch in Larven und Puppenstadien Erkenntnisse über den zeitlichen Ablauf der FGF-abhängigen Entwicklung des Atmungsorgans von *Drosophila* gewinnen. Das Spalten von Zellkernbestandteilen, wie etwa den Histonen könnte das Verständnis der Epigenetik vertiefen. Durch das TEV-Protease-vermittelte Schneiden von Komponenten der extrazellulären Matrix wie Cadherinen, Lamininen, Integrinen und verschiedenen Glykoproteinen könnte die Zelladhäsion und Zellkommunikation funktionell gegliedert und besser verstanden werden. Darüber hinaus ist es denkbar, die TEV-Protease in verschiedene intrazelluläre Kompartimente, wie zum Beispiel in die Mitochondrien oder in den Golgi-Apparat zu schleusen, um dort Zielproteine zu studieren. In der Zukunft werden also noch weitere neue Erkenntnisse molekularer Entwicklungsprozesse und zellbiologischer Zusammenhänge durch das TEV-Protease-System möglich werden.

3.2 *hot dog* codiert eine putative Calcium-Kanal Gamma Untereinheit in *Drosophila melanogaster*

Durch die Entdeckung des Claudins Megatrachea (Behr M. *et al.*, 2003) wurden in *Drosophila* noch weitere Claudinhomologe wie etwa Sinuous (Wu V. *et al.*, 2004) gefunden. Ein weiteres Protein mit einer geringeren Sequenzähnlichkeit zu Mega ist Hot Dog (Hot). Genauere Betrachtungen zeigten, dass es in *Caenorhabditis elegans* ein Ortholog zu Hot gibt. Zu diesem Protein gibt es wiederum ein Ortholog in Vertebraten, das eine Calcium-Kanal Gamma Untereinheit CACNG5 darstellt. Es war allerdings nicht möglich, mittels einer BLAST-Suche einen direkten Bezug über die Sequenz von Hot zu CACNG5 herzustellen. Dennoch gab der *hot* mutante Phänotyp, der sich durch zitternde, abstehende Flügel beim adulten Tier äußert, Hinweise auf eine spezielle Funktion im Nervensystem. Dieser Phänotyp erinnert an *Dichaete*-Mutanten. Diese Fliegen stellen ebenfalls wie *hot* mutante Fliegen die Flügel um 45° ab, was auf Fehlen von Dichaete im Nervensystem beruhen könnte (Nambu PA. & Nambu JR., 1996; Russel SR. *et al.*, 1996). Elektrophysiologischen Untersuchungen an *hot* mutanten Larven mittels *two-electrode-voltage-clamp*-Aufnahmen an der *neuromuscular junction* (NMJ) zeigten bei niederfrequenter Stimulation eine schwache Erhöhung der Reizweiterleitung, die allerdings nicht signifikant war. Die hochfrequente Stimulation hingegen offenbarte ein deutlich abnormales Verhalten der NMJ. Während sich mit der Methode bei kontroll-NMJ's schnell eine Depression der gemessenen Ströme beobachten ließ, zeigten NMJs an *hot*-Mutanten eine initiale Faszilitierung, gefolgt von einer viel schwächeren Depression. Diese NMJs waren somit initial doppelt so leistungsfähig wie kontroll-NMJ's und offenbarten einen stark erhöhten *steady-state-level*. Dies waren eindeutige Hinweise, die Hot eine wichtige Funktion an der Synapse zusprechen. So ist es denkbar, dass Hot als inhibitorische Calcium-Kanal Gamma Untereinheit den Kanal moduliert (Varadi G. *et al.*, 1995; Hansen JP. *et al.*, 2004). Fehlt diese Untereinheit in *hot* mutanten Larven, so könnten Calcium-Kanäle leichter geöffnet werden und sich langsamer schließen, während bei

kontroll-NMJs die Calcium-Kanäle mit der Zeit inaktiviert würden (Mochida S. *et al.*, 2008). Dies könnte weitergehend dazu führen, dass durch verstärkten Calcium-Ionen-Einstrom in die Präsynapse mehr Vesikel rekrutiert werden und so eine höhere Ausdauer und Leistungsfähigkeit der NMJ entsteht. Eine weitere zusätzliche Erklärung würde auch eine Funktion von Hot an Subzonen der NMJ bieten. So wird vermutet, dass sich die NMJ funktional in phasische und tonische Axonenendungen gliedert und ein bestimmter Teil für Faszilitierungen verantwortlich ist (Kurdyak P. *et al.*, 1994). Würde dies stimmen, müsste Hot an diesen Zonen mit Antikörperfärbungen nachzuweisen sein. Offensichtlich ist dies der Fall. Antikörperfärbungen mit einem anti-Hot-Antikörper zeigten eine Lokalisation des Hot-Proteins an Subzonen der NMJ. Die Kolo-kalisierung mit dem Marker für aktive Zonen, Bruchpilot (Kittel R.J. *et al.*, 2006), lässt auf eine mögliche Interaktion mit Calcium-Kanälen schließen. Diese Resultate zeigen, dass Hot eine neue Komponente von Synapsen in *Drosophila* ist und möglicherweise eine Calcium-Kanal Gamma Untereinheit darstellt. Um Hot weiterführend zu analysieren, sollen in der Zukunft noch weitere Experimente durchgeführt werden. Da Hot offenbar in bisher unbekannten Subzonen der NMJs lokalisiert ist, können diese an *hot* mutanten NMJs mit verschiedenen elektrophysiologischen Methoden genauer charakterisiert werden. Da offenbar Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten auch an der Postsynapse eine Funktion ausüben (Fukaya M. *et al.*, 2005; Black J.L. III., 2003), soll die subzelluläre Lokalisierung von Hot mit Antikörperfärbungen weiter analysiert werden. Um biochemische Evidenzen für die Hot-Funktion zu gewinnen, sollen mittels Co-Immunopräzipitation Interaktionspartner gefunden und mit Massenspektrometrie identifiziert werden. Calcium-Kanal Gamma Untereinheiten werden mit Epilepsie in Verbindung gebracht (Letts V.A. *et al.*, 1998; Steinlein O.K. & Noebels J.L., 2000). Daher wäre es möglich, neue chemische Substanzen an *hot* mutanten Larven und Fliegen als Modell zu testen, um mögliche neue Medikamente gegen Epilepsie zu testen oder zu entwickeln.

4 Material und Methoden

4.1 Fliegenhaltung, Fliegengenetik und molekulare Manipulation

Die Zucht und Haltung der Taufliegen erfolgte in Plastikröhrchen (26, 36 und 50mm Durchmesser), die etwa zwei bis drei Zentimeter hoch mit Fliegenfutter gefüllt und mit einem Trichterfilterpapier (Sartorius, Göttingen) versehen waren. Als Verschluss dienten zwei Arten von Stopfen. Zum einen verwendete ich Baumwollstopfen mit einem Schaumstoffkern und zum anderen setzte ich Milbenstopfen (Klühspies, Retzstadt) ein. Sowohl die Watte, als auch die Spezialstopfen schützten die Fliegen vor Milbenbefall. Die Fliegen wurden alle zwei bis drei Wochen in neue Röhrchen umgesetzt. Um Fliegen auf Genotypen zu analysieren, wurden diese kurz auf einer Bimssteinfritte mit CO₂ betäubt.

4.1.1 Kreuzungen

Um die entsprechenden Genotypen und das Geschlecht der Fliegen unterscheiden zu können, wurden die Fliegen betäubt und anschließend mit einer Saugvorrichtung sortiert. Um sicherzustellen, dass nur jungfräuliche Weibchen für Kreuzungen eingesetzt wurden, mussten diese in regelmäßigen Abständen aus den Röhrchen ab gesammelt werden (alle 6h bei 25°C, alle 12h bei 22°C und mind. alle 18h bei 18°C).

4.1.2 Balancierung von transgenen Fliegenlinien

Ein mit einem Marker versehenes *balancer*-Chromosom wird eingesetzt, um eine Rekombination von letalen Mutationen oder Insertionen zu verhindern. Diese Allele können dann in stabilen Fliegenstämmen gehalten werden. Nach der Erzeugung transgener Fliegen mittels Keimbahntransformation (4.1.4) wurden einzelne

Fliegenlinien etabliert. Hierbei war es von Interesse, festzustellen auf welchem Chromosom das Transgen (P-Element) inseriert war. Es wurde je ein rotäugiges Männchen der F1-Generation der injizierten Individuen mit zwei weißäugigen *balancer*-Weibchen (zweites oder drittes Chromosom), aber auch rotäugige Weibchen mit weißäugigen *balancer*-Männchen gekreuzt:

$$\sigma^{\text{Pw}^+} \times \text{♀ } w^-/w^-;sal/CyO$$

oder

$$\text{♀ } \text{Pw}^+ \times \sigma^{\text{Pw}^+} w^-/w^-;sal/CyO$$

und

$$\sigma^{\text{Pw}^+} \times \text{♀ } w^-/w^-;Croc/TM3,Sb$$

oder

$$\text{♀ } \text{Pw}^+ \times \sigma^{\text{Pw}^+} w^-/w^-;Croc/TM3,Sb$$

Danach wurden σ^{Pw^+} und $\text{♀ } \text{Pw}^+$ mit folgenden Genotypen miteinander gekreuzt:

$$\text{Pw}^{+;+}/CyO \text{ oder } \text{Pw}^{+;+}/TM3,Sb$$

Das Auftreten von weißen Augen über dem entsprechenden *balancer* deutete auf eine Integration auf dem jeweiligen, anderen Chromosom hin. Eine X-chromosomale Integration führte zum Auftreten beider Marker in der Folgegeneration und machte bei letalen Integrationen das Kreuzen gegen einen X-Chromosom-*balancer* nötig.

4.1.3 Dechorionierung von *Drosophila*-Embryonen

Nach dem die Fliegen in einem Käfig Embryonen auf Apfelsaftagar abgelegt hatten (siehe 4.4.1 a.) wurden diese mit einem Pinsel mit Wasser in ein Sieb überführt. In diesem wurden sie mit 1,4%iger Natriumhypochlorit-Lösung (1:1 H₂O/DanKlorix; Colgate-Palmolive, Hamburg) überschichtet und für drei Minuten inkubiert. Danach wurden die dechorionierten Embryonen mit Wasser gespült.

4.1.4 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

Zur Erzeugung von transgenen Fliegenlinien wurden etwa 30min alte, dechorionierte *w¹¹¹⁸*-Embryonen auf einem Agarplättchen aufgereiht und an ein Deckglas geklebt. Nach einem Trocknungsvorgang (1min) wurden die Embryonen mit Voltalef 10S (Lehmann & Voss, Hamburg) Öl überschichtet und in den posterioren Pol mit dem entsprechenden Vektorengemisch (3µg P-Element-Vektor und 1µg $\Delta 2-3$ *helper*-Plasmid) mikroinjiziert (nach Voie AM. & Cohen S., Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd edition, 1998). Dies wurde zum Teil von Frau Tomma Eisbein in unserer Abteilung und zum Teil von VANEDIS Injection Service (Oslo, Norwegen) übernommen.

4.1.5 Mikroinjektion von Texas-Red-Dextran

Für die Vorbereitung der Mikroinjektion von Texas-Red-Dextran 10000 MW neutral (Invitrogen, Karlsruhe) wurde dieses in 1ml PBT 0,1% aufgelöst. Nach einer 1:5 Verdünnung mit Wasser wurde der Farbstoff bei 15,000 g für eine Stunde zentrifugiert, um nicht gelöste Bestandteile zu sedimentieren. Danach wurde der

Überstand mit einer Microcon YM-10-Zentrifugen-Filtereinheit (Millipore, Schwalbach) filtriert, um verbliebene größere Bestandteile zu entfernen. Der Durchfluss wurde anschließend mit einer Microcon YM-3-Zentrifugen-Filtereinheit aufkonzentriert und 1:10 mit Wasser zu einer violetten Lösung verdünnt.

Stadium 16 oder 17 Embryonen des jeweiligen Genotyps wurden dechorioniert, auf einem Agarplättchen aufgereiht und an ein Deckglas geklebt. Nach dem Trocknen (1min) wurden die Embryonen mit Voltalef 10S Öl (Lehmann & Voss, Hamburg) überschichtet und mit einem Transjector 5246 und Femtotips Mikroinjektionskapillaren (beides Eppendorf, Hamburg) mit dem gereinigten Texas-Red-Dextran in den anterioren Pol injiziert. Der verwendete Druck war variabel und abhängig vom Stadium des Embryos. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Embryonen unter einem Leica TCS SP2 Mikroskop analysiert.

4.1.6 Hitzeschock-vermittelte Genexpression

Für die Hitzeschock-vermittelte Genexpression wurden Embryonengelege (auf Apfelsaftagar) von Fliegen, deren Transgen unter Kontrolle des hsp70-Promotors ist, verwendet. Die Embryonen wurden bis zu dem gewünschten Stadium bei 25°C gehalten und die Agarplatten dann für 45min auf 37°C warmem Wasser schwimmen gelassen. Danach erfolgte eine Nachinkubation bei 22°C für vier Stunden. Entweder wurden die Embryonen fixiert oder direkt mit einem Leica TCS SP2 Mikroskop analysiert.

4.2 Zellkultur

Drosophila S2- und KC₁₆₇-Zellen (Bourouis M. & Jarry B., 1983) wurden in Gibco Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FBS gehalten. Die Zellen wurden zweimal in der Woche in frisches Medium überführt.

4.2.1 Transfektion von *Drosophila*-Zellen

Drosophila S2- und KC₁₆₇-Zellen wurden auf eine Dichte von 500000 Zellen/3ml in einer 6well-Platte, mit einem Deckgläschen versehen, verdünnt. Danach wurden sie mit dem Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Hilden) nach dem mitgelieferten Protokoll mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Falls die Induktion eines Metallothionein-Promotors nötig war, wurde nach 24h 500µM Kupfersulfat hinzu gegeben.

4.2.2 Expression von ektopischen Proteinen in Zellkultur

In *Drosophila* S2- und KC₁₆₇-Zellen wurde mittels des GAL4/UAS-Systems (Brand AH. & Perrimon N., 1993; Duffy JB., 2002) eine Überexpression von ektopischen Proteinen erreicht. Hierbei wurden pAct5C-GAL4 mit dem in den pUAST-Vektor klonierten Transgenen kotransfiziert und bei 25°C inkubiert (siehe Ergebnisse 2.1.1). Andere Zellkulturexperimente wurden mit der Expression von mit pUbiP- und pMT/V5-HisA-fusionierten Transgenen durchgeführt (siehe Ergebnisse 2.1.2).

4.2.3 Antikörperfärbung von Zellkulturen

Drosophila-Zellen wurden 15min mit PBS 5% Formaldehyd fixiert und danach mit PBS gewaschen. Es folgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 10% NHS für eine Stunde. Danach wurden die primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in PBS 10% NHS appliziert und über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am Folgetag wurde erneut mit PBS gewaschen und danach der sekundäre Antikörper in der jeweiligen Konzentration in PBS 10% NHS appliziert und für drei Stunden bei RT geschwenkt. Nachfolgend wurde erneut mit PBS gewaschen. Für eine Actinfärbung wurde Phalloidin-Alexa647 (Invitrogen) und für eine DNA-Färbung 1:1000 DRAQ5 (Biostatus Limited, Leicestershire England) nach dem letzten Waschschrift zugegeben und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Prolong Gold Antifade (Invitrogen) eingebettet.

4.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken

4.3.1 Gewinnung genomischer DNA aus Fliegen

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Fliegen wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen) eingesetzt. Die Präparation erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll.

4.3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kultur

Zur Gewinnung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurden Übernachtskulturen mit LB-Medium und dem jeweiligen Antibiotikum zur Selektion bei 37°C angezogen. Die Kulturen wurden am Folgetag geerntet. Die Präparation wurde mit Plasmid Midi und Mini Kits (Qiagen) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

4.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau diente der Linearisierung und der Exzision von DNA zur Analyse und Präparation. Im Vorfeld wurde die Konzentration der zu präparierenden DNA gemessen. Für die Verdaus wurden Typ II Restriktionsendonukleasen eingesetzt (NEB, Frankfurt am Main; Roche, Mannheim). Die Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 40 μ l mit dem für die jeweiligen Enzyme geeigneten Puffer (NEB, Frankfurt am Main; Roche, Mannheim) und, wenn nötig, mit 0,1mg/ml BSA bei 37°C für 1-3h. Für Doppelverdaus mit Enzymen deren optimale Aktivität in einem anderen Temperaturbereich liegt oder kein passender Puffer verfügbar war, wurde die DNA in zwei Schritten verdaut. Für Analysen wurden bis zu 1 μ g und für Präparationen 1-4 μ g DNA eingesetzt.

4.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Analyse und der Reinigung von DNA-Fragmenten. Eine Eigenschaft eines Agarosegels ist, dass sich verschieden lange DNA-Fragmente während der Wanderung im elektrischen Feld über das Gel auftrennen. So wandern kleine Fragmente schneller als große Fragmente. Für die Bewegung der DNA ist die negative Ladung an den Phosphatresten und somit deren Affinität für positive Ladungen (Pluspol des elektrischen Feldes) verantwortlich. Die Agarosegele wurden wie folgt hergestellt: Für ein einprozentiges Gel wurde ein Gramm Agarose mit 100ml 0,5x TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde die flüssige Agaroselösung in eine Gelform gegossen, mit 8 μ l einprozentiger Ethidiumbromid-Lösung versetzt und mit einer Pipettenspitze durchmischt. Dann wurde ein Kamm in das noch flüssige Gel gesetzt, um Kavitäten zu erzeugen. Nach Polymerisation bei 4°C wurde der Kamm entfernt, das Gel in einer Gelkammer mit Elektroden platziert und mit 0,5x TBE-Puffer

überschichtet. Die DNA wurde 1:10 mit Auftragspuffer vermischt und in die Kavitäten pipettiert. Danach wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt und die Wanderung der blau markierten DNA zum Pluspol verfolgt. Über einer UV-Lampe (260nm Wellenlänge; Herolab, Wiesloch) wurde der orange leuchtende DNA-Ethidiumbromid-Komplex beobachtet und fotografiert.

4.3.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Präparative Agarosegele wurden eingesetzt, um spezielle DNA-Fragmente voneinander zu trennen und aufzureinigen. Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden über der UV-Lampe die gewünschten DNA-Banden aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reagiergefäß 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und gewogen. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren) nach dem mitgelieferten Protokoll.

4.3.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Nach einem Restriktionsverdau von DNA entstehen Fragmente mit einer 5'-Phosphatgruppe. Bei einer Klonierung von DNA-Fragmenten in einzelverdaute Vektor-DNA kann die Religation ohne das *insert* ein Problem sein. Um eine Religation zu vermeiden, wurde die linearisierte Vektor-DNA dephosphoryliert. Hierzu wurde die DNA mit 2µl Shrimp Alkaline Phosphatase (USB, Staufien) in einem Volumen von 30µl mit dem Reaktionspuffer bei 37°C für 30min inkubiert. Danach erfolgte eine Inaktivierung der Phosphatase bei 65°C für 20min. Die DNA wurde danach direkt für die Ligationsreaktion eingesetzt.

4.3.7 Ligieren von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden, gereinigten DNA Fragmente wurden in dem gewünschten molaren Verhältnis (normalerweise Vektor:*insert* = 1:3) in einer 15µl Reaktion 30min bei RT ligiert. Hierfür wurde 1µl T4-DNA-Ligase (Fermentas) mit T4-DNA-Ligase-Puffer (Roche) eingesetzt.

4.3.8 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Je 50µl chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis ca. 30min lang aufgetaut, die/der gekühlte DNA-Lösung/Reaktionsansatz zugegeben und durch Antippen des Reagiergefäßes gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock der Zellen für 45sek bei 42°C im Wasserbad. Danach wurden sie zurück in das Eisbad gegeben und 2min gekühlt. Anschließend gab man 400µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) auf die Zellen und ließ diese 45min bei 37°C schütteln. Die Zellen wurden schließlich auf LB-Agarplatten in zwei Volumina (50µl und 400µl) appliziert und mit einem Drigalski-Spatel unter sterilen Bedingungen verteilt. Die Platten wurden 18h bei 37°C inkubiert.

4.3.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Stücken basierend auf einer DNA-Matrize (*template*). Hierbei wird durch ein abwechselndes Schmelzen und Hybridisieren des *templates* mit Oligonukleotiden aus Deoxynukleotiden (dNTPs, NEB) mithilfe einer DNA-Polymerase ein spezifisches Stück DNA matrizenhomolog synthetisiert. Es wurden für analytische PCRs die *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen) und für präparative PCRs

die hochgenaue *PfuUltra*-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA USA) eingesetzt. Als *template* diente genomische, als auch Plasmid-DNA. Für eine PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

1µl	DNA (10-100ng)
1µl	5'- <i>primer</i> (10pM)
1µl	3'- <i>primer</i> (10pM)
1µl	dNTP-Mix (2mM)
0,5µl	DNA-Polymerase
4µl	10x Polymerase-Puffer
31,5µl	H ₂ O

Für eine typische PCR-Reaktion wurden folgende Inkubationsschritte in die MyCycler PCR-Maschine (Biorad, München) einprogrammiert:

95°C	45sek	35 Zyklen
94°C	45sek	
55°C	30sek	
72°C/68°C	0,5 - 3min	
72°C/68°C	10min	
4°C	unbegrenzt	

Die *Taq*-DNA-Polymerase hat ihr Optimum bei 72°C und die *PfuUltra*-DNA-Polymerase bei 68°C. Die *annealing* Temperatur (hier 55°C) kann je nach verwendeten Oligonukleotiden variieren.

4.3.10 TOPO-Reaktion mit DNA-Fragmenten

Gelgereinigte PCR-Produkte lassen sich elegant mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) und dem Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit in einen TOPO-Vektor (pCR2.1-, pCRII- oder pCR-Blunt II-TOPO-Vektor) inserieren. Hierzu wurde 4 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl *salt solution* und 1 µl TOPO-Vektor vermischt und 25min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Transformation nach 4.3.8. Für das TOPO TA Cloning Kit sind Adenosinmonophosphat-Überhänge nötig, die von der *Taq*-DNA-Polymerase angehängt werden. Das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit wurde für PCR-Produkte verwendet, die mit der *PfuUltra*-DNA-Polymerase synthetisiert wurden.

4.3.11 Anhängen von Adenosinmonophosphat-Überhängen an *blunt end* PCR-Produkte

PCR-Produkte, die mit der *PfuUltra*-DNA-Polymerase synthetisiert wurden, besitzen keine Adenosinmonophosphat-Überhänge, die für die TOPO TA-Klonierung nötig sind. Für den Fall, dass das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit nicht verwendet werden mochte, wurde dem gelgereinigten PCR-Produkt 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase, 1 µl dNTPs, dem gewünschten finalen Volumen (meist 30 µl) entsprechend *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer zugegeben und für 30min bei 72°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend über das NucleoSpin Extract II Kit (siehe 4.3.5) aufgereinigt und die DNA-Konzentration bestimmt. 4 µl DNA-Lösung wurden nun für die TOPO-Reaktion eingesetzt.

4.3.12 Gerichtete Mutagenese von DNA-Sequenzen

Die gerichtete Mutagenese von Sequenzen/Genen ermöglicht es, diese zu erweitern, abzuändern oder zu deletieren. So ist z. B. es möglich über einmutagenisierte Restriktionsschnittstellen ein Gen mit einem anderen zu kombinieren. Hierfür wurden die codierenden Sequenzen in den pUC18-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot) kloniert. Die Mutagenesereaktion und das *primer*-Design wurde mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

4.3.13 Ligasefreie Klonierung mittels In-Fusion Reaktion

Die In-Fusion Klonierungstechnik erlaubt es, ein oder mehrere PCR-Fragmente, ohne Zwischenklonierung, zusammen in einen linearisierten Vektor einzufügen. Durch Homologien an den Enden der DNA-Stücke werden, während der Reaktion mit einer speziellen viralen DNA-Polymerase, unter diesen gerichtete Hybride ausgebildet. Die Hybride werden nach dem Transformieren in *E. coli* von endogenen Enzymen ligiert. Hiermit war es möglich, über speziell gewählte *primer*, TEV-Protease-Schnittstellen in das Gen *megatrachea* einzuführen. Die PCR-Produkte wurden mit der *PfuUltra*-DNA-Polymerase (siehe 4.3.9) hergestellt. Die Reaktion wurde mit dem In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit (Clontech, Mountain View, CA USA) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

4.3.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Hybridisierte, unphosphorylierte Oligonukleotide wurden benutzt, um nach einer gerichteten Mutagenese eine zusätzliche Sequenz über eine Restriktionsschnittstelle

in ein Gen einzuführen. Um aus komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotiden ein doppelsträngiges DNA-Molekül zu erzeugen, wurden die Einzelstranglösungen in gleichem molaren Verhältnis miteinander vermischt und für 5min bei 94°C aufgeschmolzen. Danach wurden sie bei RT 20min hybridisiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Hybride wurden direkt für eine Ligation (siehe 4.3.7) eingesetzt.

4.3.15 Messung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Nukleinsäuren wurden typischerweise in autoklaviertem und entmineralisiertem Wasser gelöst. Die Bestimmung der Konzentration der Lösungen wurde mit einem NanoDrop (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Tropfen Wasser auf den Sensor pipettiert und dieser kurz betätigt, um ihn zu reinigen. Nach dem Abwischen des Tropfens wurden 2µl Wasser appliziert, um die *blank*-Kurve zu ermitteln, mit der die Messergebnisse automatisch auf das Lösungsmittel normalisiert werden. Anschließend wurde das Wasser abgetupft, 2µl der zu messenden Lösung auf den Sensor pipettiert und die Messroutine gestartet. Nach Beendigung der Messreihe wurde das Gerät mit einem weichen Tuch gereinigt.

4.3.16 Vorbereitung von DNA-Proben zur Sequenzierung

DNA-Proben wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert. Für die Vorbereitung wurden pro Sequenzierreaktion 1µg DNA (in H₂O) in ein 1,5ml Reagiergefäß pipettiert und in einer ISS110 SpeedVac (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) im Vakuum getrocknet. Die Sequenzier-*primer* wurden entweder mit verschickt oder von Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Analyse der

Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit der *software* Lasergene MegAlign (DNASTAR *inc.*, Madison, WI USA).

4.3.17 Herstellung von RNA-Sonden mittels *in vitro* Transkription

RNA-Sonden wurden eingesetzt, um immunhistologisch die Transkription eines Gens in fixiertem Gewebe nachzuweisen. RNA-Sonden beinhalten mit Digoxigenin oder Fluorescein markierte Nukleotide, die mit Antikörpern detektiert werden konnten. Mit Hilfe der *whole mount in situ* Hybridisierung (siehe 4.4.5) konnte somit das Expressionsmuster eines Gens analysiert werden.

Für die *in vitro* Transkription wurde das *template* in der Weise linearisiert, dass die Transkription am 3'-Ende der cDNA stoppt und die RNA-Polymerase nicht in den Vektor hineinläuft. Etwa 10µg DNA wurde über ein Gel aufgereinigt (siehe 4.3.5). Von der gereinigten DNA wurden 1µg für den *in vitro* Transkriptionsansatz verwendet.

xµl	DNA (1µg)
1µl	10x Transkriptionspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot)
1µl	dNTP <i>labeling</i> -Mix (Roche)
1µl	RNase Inhibitor (Roche)
1µl	T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot)
xµl	H ₂ O
Σ=10µl	

Der Reaktionsansatz wurde in einem 0,5ml Reagiergefäß für 3h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zur Kontrolle ein Aliquot auf einem einprozentigem Gel

analysiert. Nach Prüfung auf erfolgte *in vitro* Transkription wurde die Sonde durch Zugabe von folgenden Reagenzien bei -20°C gefällt:

10µl	20mg/ml tRNA (Allele Biotechnology and Pharmaceuticals inc., San Diego, CA USA)
50µl	0,22M Natriumacetat
10µl	4M Lithiumchlorid

Die Pelettierung wurde in einer Biofuge 15 (Heraeus, Hanau) bei 15000rpm für 20min durchgeführt. Die Sonde wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, auf einem Thermostat 5320 (Eppendorf) bei 37°C getrocknet und in 150µl Hybe-Puffer gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.3.18 Herstellung von Embryolysaten

Die *Drosophila*-Embryonen wurden mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in Laemmli-Puffer überführt. Nach einem mechanischen Aufschluss folgte eine Inkubation für 5min bei 95°C und eine Zentrifugation für weitere 5min.

4.3.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde zur SDS-PAGE ein 12%iges Polyacrylamidgel mit 5%igem Sammelgel in einer Gusskammer gegossen und ein Kamm eingesteckt, um Kavitäten zu erzeugen. (Sambrook J., Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 1989: Zweite Auflage. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Nach der Verfestigung des Gels wurde der Kamm entfernt und 7-15µl der Probe (Lysat) sowie ein Proteinstandard in die entstandenen Kavitäten pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x SDS-

Laufpuffer gefüllt und die Spannung am Netzteil auf 50 Volt gestellt. Als sich die Banden am Trenngel gesammelt hatten wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht. Es wurde das Elektrophorese-Equipment und der Dual Color Proteinstandard von BioRad verwendet.

4.3.20 Detektion von Proteinen mittels *western blotting*

Nach einer SDS-PAGE lassen sie Proteinbanden mittels *western blotting* aus dem Gel auf eine Membran überführen und dort mit speziellen Antikörpern oder Färbemethoden nachweisen. Das SDS-Gel aus 4.3.19 wurde auf eine Nitrocellulosemembran BA85 (Schleicher und Schüll, Dassel) gelegt. Diese Anordnung wurde mit zwei saugfähigen, mit *blotting*-Puffer getränkten Kartonstücken gepolstert und in einem Käfig fixiert. In einer *blotting*-Kammer wurden die Proteine bei 150mA 90min lang auf die Nitrozellulosemembran überführt. Zur Detektion wurde die Membran dreimal für 20min mit PBT auf einem Schüttler vorsichtig gewaschen und anschließend mit 5% BSA/PBT für 1h bei RT inkubiert. Hierbei sollten die unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit PBT für 20min gewaschen. Nun erfolgte das Binden des primären (gegen das Ziel-Antigen gerichteten) vorverdünnten Antikörpers in 2,5% BSA/PBT für 1h bei RT. Vor dem Binden des sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörpers wurde abermals dreimal für 20min mit PBT gewaschen. Dann wurde der vorverdünnte sekundäre Antikörper in 2,5% BSA/PBT auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C mit dieser inkubiert. Die Verdünnungen waren spezifisch für den verwendeten Antikörper und wurden den jeweiligen Datenblättern entnommen. Am nächsten Morgen wurde die Membran ein letztes Mal mit PBT (dreimal 20min) gewaschen und anschließend auf eine Plastikfolie gelegt. Sofort gab man die ECL *western blotting* Substrat-Lösungen (Pierce, Rockford, IL USA) hinzu und inkubierte die Membran 5min. Nun wurde im

Dunkeln ein BioMax XAR Röntgenfilm (Kodak, Stuttgart. Vertrieben durch Sigma-Aldrich) aufgelegt und dieser 5sek bis zu 10min der Chemilumineszenz ausgesetzt. Nach dem Belichten wurde der Film in einer Optimax Typ TR Entwicklermaschine (MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt und analysiert.

4.3.21 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage Plasmid-DNA in sich aufzunehmen. Dies wird durch eine Inkubation bei 42°C gefördert (siehe 4.3.8). Zur deren Herstellung wurden 5µl DH5α-Zellen auf LB-Agar ohne Antibiotikum im Dreistrichverfahren ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann wurde aus mit einer einzelnen Kolonie 250ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und bei 25°C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (gemessen in einem Novaspec II Photometer (Pfizer Pharma, Karlsruhe) wachsen gelassen. Im Folgenden wurden die Zellen in TB-Puffer/7%DMSO bei 4°C überführt und Aliquots in flüssigem Stickstoff (N₂l.) schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

4.3.22 Herstellung polyklonaler Antikörper

Meerschweinchen anti-Hot Dog und anti-Megatrachea Antikörper wurden von Peptide Specialty Laboratories GmbH in Heidelberg hergestellt und aufgereinigt.

4.4 Histologische Arbeitstechniken

4.4.1 Fixierung von *Drosophila*-Embryonen

- a. Es wurden *Drosophila*-Fliegen in einen Tubus überführt, der an dem einem Ende offen und an dem anderen Ende mit einem Netz verschlossen war. Die Fliegen wurden währenddessen mit CO₂ auf einer Bimssteinfritte betäubt. Der Tubus wurde mit einer Apfelsaftagarplatte verschlossen, die mit Bäckerhefe versehen war. Die Fliegen legten nun die befruchteten Eier in den Apfelsaftagar ab.
- b. Die abgelegten Embryonen wurden mit 1,4%iger Natriumhypochlorit-Lösung (1:1 H₂O/DanKlorix [Colgate-Palmolive, Hamburg]) für drei Minuten in einem Siebchen dechorioniert und anschließend mit Wasser gespült. Dann wurden die Embryonen in 6ml Heptan und 1ml RNA-Fixativ (4% Paraformaldehyd) überführt und für 20min geschüttelt. Sofort danach gab man 10ml Methanol dazu und schüttelte für weitere 5min (Devitellinisierung). Die Heptan-Phase wurde abgenommen und die fixierten Embryonen mehrmals mit 10ml Methanol gewaschen. Bei der Hitzefixierung gab man die Embryonen nach dem Dechorionieren für 5-10sek in 80°C heißen Waschpuffer und kühlte diese dann sofort auf Eis. Die Devitellinisierung erfolgte wie oben beschrieben, allerdings ohne RNA-Fixativ. Die Lagerung erfolgte generell bei -20°C.

4.4.2 Präparation von *Drosophila*-L3-Larven

Um die *neuromuscular junction* (NMJ) von L3-Larven analysieren zu können, mussten Muskelfilets präpariert werden. Hierzu wurde die Larve auf einer Gummimatte vorne und hinten mit Minutiennadeln befestigt. Auf die Larve wurde 50µl HL3-Puffer gegeben, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Larve wurde mit einer

Präparierschere zwischen den Tracheenhauptästen von posterior nach anterior aufgeschnitten, die Epidermis mit vier Minutiennadeln aufgeklappt und befestigt. Die inneren Organe wurden mit einer Pinzette entfernt. Der HL3-Puffer wurde abgenommen und die Larve entweder für 3/10min mit RNA-Fixativ (4% Paraformaldehyd) oder für 10min mit 100%igem Ethanol fixiert. Die Larve wurde anschließend mit PBT gewaschen und in ein 1,5ml Reagiergefäß mit 10% NHS/PBT gegeben. Auf dem Drehrad wurden unspezifische Bindungsstellen für 30min blockiert.

4.4.3 Antikörperfärbungen an *Drosophila*-Embryonen und *Drosophila*-Larven

Die Embryonen wurden zunächst mit PBT rehydriert und somit das Methanol entfernt. Hierzu wurden diese 4 mal mit PBT auf dem Drehrad gewaschen. Die Embryonen oder Larven wurden in 2% Schafserum/PBT über Nacht mit den primären Antikörpern bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Am Folgetag wurde 6 mal mit PBT gewaschen und die Embryonen oder Larven in 2% Schafserum/PBT für 2h bei RT im Dunkeln mit den sekundären Fluorophor-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Zum Schluss wurde 8 mal mit PBT gewaschen und das Material in VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Labs, Burlingame, CA USA) eingebettet. Sollte das Signal zu schwach gewesen sein, wurden Biotin-gekoppelte sekundäre Antikörper eingesetzt und mit dem VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Labs) und dem TSA-Cy2/Cy3-Kit (PerkinElmer, Waltham, MA USA) verstärkt. Dies wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Die Beobachtung erfolgte unter einem Leica TCS SP2 oder SP5 Mikroskop.

4.4.4 Färbung von *Drosophila*-Embryonen mit Chitin-binding Probe

Im Zuge einer Antikörperfärbung wurde zusammen mit den sekundären Antikörpern Chitin-binding Probe (CBP, NEB) in einer finalen Verdünnung von 1:1000 eingesetzt

4.4.5 *whole mount in situ* Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen

In Methanol gelagerte Embryonen wurden 2 mal mit PBT rehydriert. Dann wurde mit einer 1:1 RNA-Fixativ/PBT Lösung für 20min fixiert und anschließend 4 mal mit PBT gewaschen. Nun folgte ein „Anverdauen“ der Embryonen mit 10µl Proteinase-K Lösung (5mg/ml) für 90sek. Nun wurde sofort die Proteinase-K 2 mal mit PBT herausgewaschen und erneut mit einer 1:1 RNA-Fixativ/PBT Lösung für 20min fixiert. Danach wusch man wieder 4 mal mit PBT. Es folgte nun die Überführung in Hybridisierungspuffer, indem man 250µl PBT und 250µl Prä-Hybridisierungslösung hinzu gab. Es wurde dann einmal mit 250µl Prä-Hybridisierungslösung gewaschen bevor zu den Embryonen 250µl Hybridisierungslösung zugegeben wurde. Nach dem Erneuern der Hybridisierungslösung wurde bei 70°C für 1h im Wasserbad inkubiert, bevor 1-3µl antisense-RNA Sonde (siehe 4.3.17) zugegeben wurde und über Nacht in dem Ansatz bei 70°C verblieb. Am Folgetag wurden Prä-Hybridisierungslösung und Hybridisierungslösung auf 70°C erwärmt. Die anti-Digoxigenin oder anti-Fluorescein Antikörper wurden an fixierten, rehydrierten Embryonen (Genotyp und Alter waren hier unwichtig) in PBT auf dem Drehrad bei RT für 3h präabsorbiert. Auf den *in situ* Hybridisierungsansatz wurden nacheinander 500µl Hybridisierungslösung und 500µl Prä-Hybridisierungslösung pipettiert und dazwischen für 15min bei 70°C inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz durch 6 maliges Waschen mit PBT von den Hybridisierungslösungen befreit. Bei Detektion

der hybridisierten Sonde mit AP-gekoppelten Antikörpern folgte eine Umpufferung in AP-Puffer und die Entwicklung mit 4,5 μ l NBT und 3,5 μ l X-Phosphat in einem Färbeschälchen. Für eine Detektion mit Fluoreszenz wurden Peroxidase-gekoppelte Antikörper eingesetzt. Hierfür wurde das Signal mit dem TSA-Cy2/Cy3-Kit detektiert. Die Beobachtung erfolgte unter einem Zeiss Axiophot oder unter einem Leica TCS SP2 Mikroskop.

4.5 Erhebung der Daten

4.5.1 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Mikroskopie ermöglicht eine schicht- und punktgenaue Abbildung der Lokalisation eines fluoreszenten Stoffes innerhalb eines Objektes. Die in dieser Arbeit analysierten, fluoreszenten Signale wurden mit einem Leica TCS SP2 oder SP5 Mikroskop aufgenommen.

4.5.2 Epifluoreszente Mikroskopie

Fluoreszente Signale wurden neben der konfokalen Mikroskopie unter einem Zeiss Axiovert 200M und Zeiss Axiophot Mikroskop analysiert.

4.5.3 Elektrophysiologie an *Drosophila*-L3-Larven

Für elektrophysiologische Ableitungen wurden an L3-Larven *two-electrode-voltage-clamp*-Aufnahmen von an Nerven evozierten postsynaptischen Strömen an der neuromuskulären Verbindung 6/7 (*neuromuscular junction*, NMJ) des ventral-

longitudinalen Muskel 6 im Segment A2 oder A3 durchgeführt. Die Daten wurden einem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test unterzogen. Die Arbeiten wurden 2006 zusammen mit Dr. Robert Kittel am European-Neuroscience-Institute in Göttingen durchgeführt (vergleiche Kittel RJ. *et al.*, 2006).

4.5.4 *in silico* Sequenzanalyse

DNA-Sequenzen wurden mit der *software* Lasergene (DNASTAR *inc.*, Madison, WI USA) analysiert. Zu deren Bearbeitung wurden die Programme EditSeq, MegAlign und SeqBuilder herangezogen. Für die *online* Sequenzanalyse wurde die Internet-Seite vom *Center for Biological Sequence Analysis* und NCBI BLAST benutzt: <http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml> und <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

4.5.5 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung von Bildern erfolgte mit Photoshop (Adobe Creative Suite 2, San Jose, CA USA). Die Erstellung von Schemata und Abbildungen wurde mit Illustrator und Photoshop (Adobe Creative Suite 2, San Jose, CA USA) sowie mit CINEMA 4D R10 (Maxon, Friedrichsdorf) durchgeführt. Die Visualisierung von Protein-Strukturdaten erfolgte mit MacPyMol 2006 (DeLano Scientific, Palo Alto, CA USA).

4.5.6 Videoaufnahmen

Videoaufnahmen von Fliegen wurden am IWF Wissen und Medien gGmbH in Göttingen durchgeführt.

4.6 Material

4.6.1 Verwendete Fliegenlinien

Fliegenlinie	Bezugsquelle
OreR (WT)	Bloomington, IN USA
<i>w¹¹¹⁸</i>	Bloomington, IN USA
<i>mega¹²</i>	Behr M. <i>et al.</i> , 2003
<i>mega¹</i>	Küstner K., unpubliziert
GE2654	GenExel Inc., Daejeon South Korea
GE155	GenExel Inc., Daejeon South Korea
GE23954	GenExel Inc., Daejeon South Korea
<i>btl</i> -GAL4	Shiga Y. <i>et al.</i> , 1996
G445-GAL4	Hoch M., Bonn
<i>actin</i> -GAL4	Ito K. <i>et al.</i> , 1997
<i>tubulin</i> -GAL4	Lee T. & Luo L., 1999
ok6-GAL4	Aberle H. <i>et al.</i> , 2002
ok6-GAL4, UAS- <i>cac^{EGFP}</i> / <i>Cyo</i>	Sigrist S., Würzburg
<i>elav</i> -GAL4	Campos AR. <i>et al.</i> , 1987
MHC-GAL4	Schuster CM. <i>et al.</i> , 1996
RNAi CG6398 (Wien ID:9146)	VDRC, Wien Österreich
<i>hot¹²</i>	Selbst erzeugt
<i>hot⁹</i>	Selbst erzeugt
<i>hot rescue</i> mCherry	In dieser Arbeit erzeugt
UAS- <i>hot</i>	In dieser Arbeit erzeugt
UAS- <i>hot</i> -mCherry	In dieser Arbeit erzeugt
UAS- <i>hot</i> -GFP	In dieser Arbeit erzeugt
joGE2654	In dieser Arbeit erzeugt
UAS-TEV	In dieser Arbeit erzeugt
<i>mega</i> -TEVpcs-YFP	In dieser Arbeit erzeugt
<i>mega</i> -TEVpcs-CTerm	In dieser Arbeit erzeugt
hs-TEV	In dieser Arbeit erzeugt
UAS-WgSP-Flag-TEV	In dieser Arbeit erzeugt

Fliegenlinie	Bezugsquelle
UAS-WgSP-mCherry-TEV	In dieser Arbeit erzeugt
<i>mega rescue</i> TEVpcs-Glu54	In dieser Arbeit erzeugt
<i>mega rescue</i> TEVpcs-Pro107	In dieser Arbeit erzeugt
UAS- <i>cam</i> -TEVpcs- <i>cam</i>	In dieser Arbeit erzeugt
UAS- <i>btl</i> -TEVpcs-CTerm	In dieser Arbeit erzeugt

4.6.2 Verwendete *Drosophila*-Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
S2	Drosophila Genomics Resource Center (Bloomington, IN USA)
KC ₁₆₇ (Bourouis M. & Jarry B., 1983)	Drosophila Genomics Resource Center (Bloomington, IN USA)

4.6.3 Verwendete *E. coli*-Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
DH5α <i>F</i> - ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
TOP10 <i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

4.6.4 Medien

Apfelsaftagar	2,8% Agar-Agar 33% Apfelsaft (becker´s bester, Lütgenrode) 3,3% Saccharose 1,3% 15%ige Nipagin-Lösung (in Ethanol) in <i>aqua dest.</i>
Fliegenfutter	8% Maismehl 8% Malz 2,2% Zuckerrübensirup 1,8% Trockenhefe 1% Sojamehl 0,15% Nipagin 0,63% Propionsäure 0,5% Ethanol 0,63% Agar in <i>aqua dest.</i>
Gibco Schneider´s <i>Drosophila</i> Medium (Invitrogen, Stuttgart)	1% Penicillin/Streptomycin und 10% FBS sterilfiltriert
LB-Agar	3,4% LB Agar (Invitrogen, Karlsruhe) in <i>aqua dest.</i>
LB-Medium	2% LB Broth Base (Invitrogen, Karlsruhe) in <i>aqua dest.</i>

4.6.5 Puffer und Lösungen

Alkalische-Phosphatase- Puffer (AP-Puffer)	100mM Tris/HCl (pH 9,5) 100mM NaCl 50mM MgCl ₂ 1mM Levamisol 0,1% Tween 20
---	---

6x Auftragspuffer (Agarosegele)	4g Saccharose 25mg Bromphenolblau 25mg Xylen Cyanol <i>ad. 10ml aqua dest.</i>
1x blotting-Puffer	2.4g Tris-HCl 11.2g Glycin 160ml Methanol
Ethidiumbromid-Lösung (4°C)	1% Ethidiumbromid
HL3-Puffer (Calcium-frei)	115ml 1M Saccharose 20ml 1M MgCl ₂ 14ml 5M NaCl 10ml 1M NaHCO ₃ 5ml 1M Hepes 5ml 1M KCl 5ml 1M Trehalose <i>ad. 1000ml aqua dest.</i>
Hybridisierungslösung	50% Formamid (deionisiert) 5x SSC 200 µg/ml ssDNA 100 µg/ml tRNA 50 µg/ml Heparin pH 5,0
Prä-Hybridisierungslösung	50% Formamid (deionisiert) 5x SSC
1x Laemmli-Puffer	625mM Tris-HCl pH 6.8 5% SDS 10% Glycerin 0.001% Bromphenolblau 25mM DTT

Na-PO ₄ -Puffer 1M, pH 7,4	77,4ml, 1M Na ₂ HPO ₄ 22,6ml, 1M NaH ₂ PO ₄
NBT-Lösung (-20°C):	18,75mg / ml 4-Nitrobluetetrazoliumchlorid in 67% Dimethylformamid
PBS (10x):	1,3M NaCl 100mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 7,4
PBS (1x) 5% Formaldehyd (4°C)	861ml PBS + 139ml 36%iges Fomaldehyd
PBT:	PBS (1X) 0,1% Tween 20
Penicillin/Streptomycin (-20°C)	10mg / ml final sterilfiltriert
Proteinase-K-Lösung (-20°C):	5mg / ml
RNA-Fix-Lösung (4°C)	10% Paraformaldehyd in PBS 50mM EGTA pH 7,0
Sammelgel-Puffer	1.5M Tris-HCl pH 8.8 0.4% w / v SDS
10x SDS-Laufpuffer	250mM Tris-HCl pH 8.8 1.92M Glycin 1% SDS

TB-Puffer	18,65g Kaliumchlorid 2,2g Calciumchlorid 10mM PIPES 55mM Manganchlorid <i>ad. 1000ml aqua dest.</i> pH 6,7
10x TBE-Puffer	108g Tris-Base 55g Borsäure 40ml 0,5M EDTA (pH 8,0) <i>ad. 1000ml aqua dest.</i>
Trenngel-Puffer	0.5M Tris-HCl pH 6.8 0.4% SDS
Trypan-Blau-Lösung	0,2%
Waschpuffer	70mM NaCl 0,1% Triton X-100
X-Phosphat-Lösung (BCIP; -20°C):	9,4mg / ml 5-Bromo-4-chloro-3-indylphosphat in 67% Dimethylformamid

4.6.6 Chemikalien

Alle Feinchemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Hamburg), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Agarose	Lithiumchlorid
Ammoniumpersulfat	Magnesiumchlorid
Ampicillin	Magnesiumsulfat
Borsäure	Methanol
Bromphenolblau	Natriumacetat
BSA	Natriumazid

Calciumchlorid	Natriumchlorid
Chloramphenicol	Natriumdihydrogenphosphat
Chloroform	Natriumhydrogencarbonat
Dimethylformamid	Natriumhydroxid
Dinatriumhydrogenphosphat	Natriumhypochlorit
DTT	n-Heptan
EDTA	Nipagin
Essigsäure	Papaformaldehyd
Ethanol	Penicillin
Ethidiumbromid	Phenol
Formaldehyd	Propanol
Formamid	Propionsäure
Glucose	Saccharose
Glycerin	Salzsäure
Glycin	SDS
Heparin	Streptomycin
HEPES	Tetracyclin
Kaliumchlorid	Trehalose
Kaliumhydroxid	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Kanamycin	Triton X-100
Kupfersulfat	Tween20
Levamisol	Xylen Cyanol

4.6.7 Enzyme, Reagenzien und Kits

Produkt	Bezugsquelle
10x Transkriptionspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Deoxynukleotide (dNTPs)	NEB, Frankfurt am Main
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
dNTP <i>labeling</i> -Mix	Roche, Mannheim
DRAQ5	Biostatus Limited, Leicestershire England
Dual Color Proteinstandard	Biorad, München
ECL <i>western blotting</i> Substrat	Pierce, Rockford, IL USA
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	Sigma-Aldrich, Hamburg
In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech, Mountain View, CA USA
NHS (<i>normal horse serum</i>)	Vector Labs, Burlingame, CA USA
Nitrocellulosemembran BA85	Schleicher und Schüll, Dassel
NucleoSpin Extract II Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
<i>PfuUltra</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA USA
Phalloidin Alexa647	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Midi und Mini Kits	Qiagen, Hilden
Prolong Gold Antifade	Invitrogen, Karlsruhe
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA USA
Restriktionsendonukleasen Typ II	NEB, Frankfurt am Main; Roche, Mannheim
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Produkt	Bezugsquelle
Schafserum	Sigma-Aldrich, Hamburg
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB, Staufeu
T3-, T7- und SP6-RNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase Puffer	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
tRNA	Allele Biotechnology and Pharmaceuticals inc., San Diego, CA USA
TSA-Cy2/Cy3-Kit	PerkinElmer, Waltham, MA USA
Vectashield Mounting Medium	Vector Labs, Burlingame, CA USA
VECTASTAIN Elite ABC Kit	Vector Labs, Burlingame, CA USA
Voltalef 10S	Lehmann & Voss, Hamburg
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

4.6.8 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Biofuge 15	Heraeus, Hanau
BioMax XAR Röntgenfilm	Kodak, Stuttgart. Vertrieben durch Sigma-Aldrich, Hamburg
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Fliegen-Monitore	TriKinetics, Waltham, MA USA
ISS110 SpeedVac	Thermo Scientific, Waltham, MA USA

Gerät	Bezugsquelle
Microcon YM-10-, YM-3-Zentrifugen-Filtereinheit	Millipore, Schwalbach
MyCycler PCR-Maschine	Biorad, München
NanoDrop	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Novaspec II Photometer	Pfizer Pharma, Karlsruhe
NucleoSpin Extract II Kit	MACHERY-NAGEL, Düren
Optimax Typ TR Entwicklmaschine	MS Laborgeräte, Wiesloch
Plasmid Midi und Mini Kits	Qiagen, Hilden
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Transjector 5246 und Femtotips Mikroinjektionskapillaren	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampe (260nm Wellenlänge)	Herolab, Wiesloch

4.6.9 Vektoren

Vektor	Bezugsquelle
pUC18	Fermentas, St. Leon-Rot
pCaSpeR4	Drosophila Genomics Resource Center (Bloomington, IN USA)
pCaSpeR-hs	Drosophila Genomics Resource Center (Bloomington, IN USA)
pUAST	Drosophila Genomics Resource Center (Bloomington, IN USA)
pBluescript SK(+)	Fermentas, St. Leon-Rot

Vektor	Bezugsquelle
pUbiP	A. Herzig, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen
pAct5C-GAL4	Bond-Matthews B. & Davidson N., 1988
pCMV-Myc	Clontech, Mountain View, CA USA
pMT/V5-His A	Invitrogen, Karlsruhe
pOT2A	Berkeley Drosophila Genome Project, Berkeley, CA USA
pEGFP-N1	Clontech, Mountain View, CA USA
pSL1180	Pfizer Pharma, Karlsruhe
pACYCDuet-1	Novagen, San Diego, CA USA
pVENUS-N1	Nagai, T. <i>et al.</i> , 2002

4.6.10 Primer

Primer	Konstrukt
5' <i>Eco</i> RI CG6398 UAS-ORF(cDNA) GGAATTCAGCATGCCCTGCTCGGCC	pUAST- <i>hot dog</i> -GFP
3' <i>Xho</i> I CG6398 UAS-ORF(cDNA) CCGCTCGAGCTAGTAGTTGTAGGGTCC	pUAST- <i>hot dog</i> -GFP
5' <i>Eco</i> RI cDNA-CG6398 5'-UTR GGAATTCCGAACGTTGTTGCGATCACA A	pUAST- <i>hot dog</i>
3' <i>Xho</i> I cDNA-CG6398 3'-UTR CCGCTCGAGTTTTAGCTTAGATACATAC ACATAT	pUAST- <i>hot dog</i>
5' <i>Not</i> I RNAi sense1-600 CG6398 ATAAGAATGCGGCCGCCGAACGTTGTT GCGATCAC	pUAST- <i>hot dog</i> -RNAi

Primer	Konstrukt
3' <i>Xho</i> I RNAi sense1-600 CG6398 CCGCTCGAGTGGTTGCGCCAGACATCG	pUAST- <i>hot dog</i> -RNAi
5' <i>Xba</i> I RNAi antise1-600 CG6398 GCTCTAGACGAACGTTGTTGCGATCAC	pUAST- <i>hot dog</i> -RNAi
3' <i>Kpn</i> I RNAi antise1-600 CG6398 5'- GGGGTACCTGGTTGCGCCAGACATCG	pUAST- <i>hot dog</i> -RNAi
5jo-1000bp ATG GCAGGCAATGATATTGACGTGTC	Charakterisierung der <i>hot dog</i> -Mutanten
3jo-1000bp ATG CTACTCCGCACAGTGGGC	Charakterisierung der <i>hot dog</i> -Mutanten
3jo-750bp ATG GAAATTATGGAGATATTCGTTCCG	Charakterisierung der <i>hot dog</i> -Mutanten
3jo-500bp ATG CAATTTCCCTACCCATTTTAAATATTTCC A	Charakterisierung der <i>hot dog</i> -Mutanten
5mut-cDNAhot-2- <i>Bam</i> HI- <i>Psp</i> OMI GGACCCTACAACCTACGGGGATCCCACG GGCCCGGGCCAGCCAGCTT	pUAST- <i>hot dog</i> -mCherry <i>hot dog rescue</i> mCherry
3mut-cDNAhot-2- <i>Bam</i> HI- <i>Psp</i> OMI AAGCTGGCTGGCCCGGGCCCGTGGGAT CCCCGTAGTTGTAGGGTCC	pUAST- <i>hot dog</i> -mCherry <i>hot dog rescue</i> mCherry
5'mCherry- <i>Bam</i> HI CGGGATCCGATGGTGAGCAAGGGCGA G	pUAST- <i>hot dog</i> -mCherry <i>hot dog rescue</i> mCherry
3'mCherry- <i>Psp</i> OMI GAGAGGGCCCTTACTTGTACAGCTCGT CCATG	pUAST- <i>hot dog</i> -mCherry <i>hot dog rescue</i> mCherry
5' <i>Spe</i> I-5'genom. reg. <i>hot dog</i> ACTAGTAGCAAAAGGTTTAAGTCTGAT GATGT	<i>hot dog rescue</i> mCherry
3' <i>Age</i> I-5'genom. reg. <i>hot dog</i> ACCGGTTTGGAAGGCACAGCAAAAAA AAAG	<i>hot dog rescue</i> mCherry

Primer	Konstrukt
5' <i>AgeI</i> -5'UTR cDNA <i>hot dog</i> ACCGGTTGCTGCTCTTTAACTGTGTAT T	<i>hot dog rescue mCherry</i>
3' <i>KpnI</i> -3'UTR cDNA <i>hot dog</i> GGTACCTTTTAGCTTAGATACATACACA TATTTCTTTATTATT	<i>hot dog rescue mCherry</i>
5' <i>PspOMI</i> -cDNA <i>hot dog</i> GGGCCCCGGGCCAGCCAGCTTCAG	<i>hot dog rescue mCherry</i>
3' <i>KpnI</i> -3' genom. reg. <i>hot dog</i> GGTACCGTCTATCGGAAATCGGTGAGC	<i>hot dog rescue mCherry</i>
5' <i>mega</i> mut. <i>NotI</i> AGCCTGCAGGGCTACATATGCGGCCGC TCCGCCCGACTTCCAT	<i>mega rescue TEV VENUS</i>
3' <i>mega</i> mut. <i>NotI</i> ATGGAAGTCGGGCGGAGCGGCCGCAT ATGTAGCCCTGCAGGCT	<i>mega rescue TEV VENUS</i>
5' TEV-YFP- <i>NotI</i> ATAAGAATGCGGCCGCGAGAACCTGTA TTTTTCAGGGCGGCATGGTGAGCAAGGG CGAGGA	<i>mega rescue TEV VENUS</i>
3' TEV-YFP- <i>NotI</i> ATAAGAATGCGGCCGCTTACTTGTACA GCTCGTCCATGCC	<i>mega rescue TEV VENUS</i>
5' <i>mega</i> mut. <i>NotI</i> -CTerm CCTGCAGCGCGAGGCCCGGCAAGCGG CCGCCGCCTACGACGCCCGCGGCGAG C	<i>mega rescue TEV-CTerm</i>
3' <i>mega</i> mut. <i>NotI</i> -CTerm GCTCGCCGCGGGCGTCGTAGGCGGCG GCCGCTTGCCGGGCCTCGCGCTGCAGG	<i>mega rescue TEV-CTerm</i>
5' <i>NotI mega</i> TEV-CTerm AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAGAAC CTGTATTTTCAGGGCGCCTACGACGCC CGCGGCGAGCAGA	<i>mega rescue TEV-CTerm</i>
3' <i>BamHI mega</i> TEV-CTerm CGGGATCCGATCACATCCGCACCTCAT CACCAG	<i>mega rescue TEV-CTerm</i>

Primer	Konstrukt
5' mut. <i>btl</i> -RA <i>SpeI</i> 2248 ATAACGTTTCATGCTGACTAGTCGTCGG CTGAGGAGG	pUAST- <i>btl</i> -TEVpcs-CTerm
3' mut. <i>btl</i> -RA <i>SpeI</i> 2248 CCTCCTCAGCCGACGACTAGTCAGCAT GAACGTTAT	pUAST- <i>btl</i> -TEVpcs-CTerm
5' <i>SpeI</i> TEV CTAGTGAGAACCTGTATTTTCAGGGCG	pUAST- <i>btl</i> -TEVpcs-CTerm
3' <i>NheI</i> TEV CTAGCGCCCTGAAAATACAGGTTCTCA	pUAST- <i>btl</i> -TEVpcs-CTerm
5' TEV 3xNLS ATCGAGAACCTGTATTTTCAGGGCCAT ATGGGCGATCCAAAAAAGAAGAGAGAAA GGTAGATCCAAAAAAGAAGAGAGAAAGG TAGATCCAAAAAAGAAGAGAGAAAGGTA GGAGG	pUAST-CD8-EGFP-TEVpcs-NLS-mCherry
3' TEV 3xNLS CCTCCTACCTTTCTCTTCTTTTTTGGATC TACCTTTCTCTTCTTTTTTGGATCTACCT TTCTCTTCTTTTTTGGATCGCCCATATGG CCCTGAAAATACAGGTTCTCGAT	pUAST-CD8-EGFP-TEVpcs-NLS-mCherry
5' <i>mega</i> TEV In Fusion Glu54 CTGTATTTTCAGGGCTCCTACGAGGAG ACGCGGGC	<i>mega rescue</i> TEV 1te extrazell. Domäne Glu54
5' <i>mega</i> TEV In Fusion Glu54 GCCCTGAAAATACAGGTTCTCCTCGAT CCAGTACGGCGA	<i>mega rescue</i> TEV 1te extrazell. Domäne Glu54
5' <i>mega</i> TEV In Fusion Pro107 CTGTATTTTCAGGGCGGCTGGCTCATGG CGGTGCA	<i>mega rescue</i> TEV 1te extrazell. Domäne Pro107
5' <i>mega</i> TEV In Fusion Pro107 GCCCTGAAAATACAGGTTCTCGCCGGG CAGCAGATACTCACG	<i>mega rescue</i> TEV 1te extrazell. Domäne Pro107
5' <i>EcoRI mega</i> ATTAACCTTACATACATACTA	<i>mega rescue</i> TEV 1te extrazell. Domäne Glu54 / Pro107

Primer	Konstrukt
3' <i>Bam</i> HI <i>mega</i> GAGGTCGACTCTAGA	<i>mega rescue</i> TEV 1te extrazell. Domäne Glu54/Pro107
5' In Fusion WgSP-TEV-Flag/ mCherry AGGGAATTGGGAATTCATGGATATCAG CTATATCTTCGTCA	pUAST-WgSP-Flag/ mCherry-TEV
3' In Fusion WgSP-TEV-Flag ATGGCCATTCGAATTCCCTTGTCATCGT CATCCTTGTAAT	pUAST-WgSP-Flag-TEV
3' In Fusion WgSP-TEV-mCherry ATGGCCATTCGAATTCCCTTGTCACAGCT CGTCCATGC	pUAST-WgSP-mCherry-TEV
5' In Fusion <i>cam</i> Thr80 CTGTATTTTCAGGGCACCGATAGCGAA GAGGAGAT	pUAST- <i>cam</i> -TEVpcs- <i>cam</i>
3' In Fusion <i>cam</i> Asp79 GCCCTGAAAATACAGGTTCTCGCCGTC CTTCATTTTGCGTGCCAT	pUAST- <i>cam</i> -TEVpcs- <i>cam</i>
5' In Fusion <i>cam</i> NotI AACAGATCTGCGGCCGCATGGCCGATC AGCTGACAGA	pUAST- <i>cam</i> -TEVpcs- <i>cam</i>
3' In Fusion <i>cam</i> XhoI TAGAGGTACCCTCGAGTCACTTCGATG TCATCATAGTCAC	pUAST- <i>cam</i> -TEVpcs- <i>cam</i>

4.6.11 Antikörper und Färbemittel

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG (H+L) <i>*highly cross-adsorbed*</i>	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 568 Ziege anti-Maus IgG (H+L) <i>*highly cross-adsorbed*</i>	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) <i>*highly cross-adsorbed*</i>	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 568 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) <i>*highly cross-adsorbed*</i>	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Meerschweinchen IgG (H+L) <i>*highly cross-adsorbed*</i>	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 568 Ziege anti-Meerschweinchen IgG (H+L) <i>*highly cross-adsorbed*</i>	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Biotin-SP-AffiniPure F (ab') ₂ Fragment Ziege anti-Maus IgM	1:500	Jackson ImmunoResearch, DIANOVA GmbH, Hamburg
Ziege Biotin-konjugierter anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:500	Vector Labs, Burlingame, CA USA
Ziege Biotin-konjugierter anti-Kaninchen IgG (H+L)	1:500	Vector Labs, Burlingame, CA USA

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Ziege Biotin-konjugierter anti-Meerschweinchen IgG (H+L)	1:500	Vector Labs, Burlingame, CA USA
Schaf anti-Fluorescein-AP, Fab Fragmente	1:1000	Roche, Mannheim
Schaf anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	1:1000	Roche, Mannheim
Schaf anti-Fluorescein-POD, Fab Fragmente	1:1000	Roche, Mannheim
Schaf anti-Digoxigenin-POD, Fab Fragmente	1:1000	Roche, Mannheim
Maus anti-Coracle	1:200	Abcam, Cambridge, England
Maus anti-Bruchpilot IgG Nc82	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA
Maus anti-Spectrin IgG 3A9	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA
Maus anti-Crumbs IgG Cq4	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA
Maus anti-Armadillo IgG 7A1	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA
Maus anti-Sex lethal IgG M18	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA
Maus anti-Tracheensystem IgM 2A12	1:8	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA
Kaninchen anti-RFP	1:500	Rockland, Gilbertsville, PA USA

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Kaninchen anti-GFP	1:1000	Synaptic Systems, Göttingen
Meerschweinchen anti-Hot gegen PYANYAQPQIYPGPYYH GSQYGPYNY gerichtet	1:100	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Meerschweinchen anti-NTerm-Mega gegen MRELNKQQSQDSTDG VEKGDYPRATNG gerichtet	1:200	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Kaninchen anti-Mega-CTerm	1:20	Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen
Maus anti-myc	1:2	Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen
Maus anti-Lamin IgG Dm0	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank, Bloomington, IN USA

Reagenz	Verwendung	Hersteller
Fluorescein konjugierte Chitin-binding Probe	1:500	NEB, Frankfurt
Rhodamin konjugierte Chitin-binding Probe	1:500	NEB, Frankfurt
Texas-Red-Dextran 10000 MW neutral	variabel	Invitrogen, Karlsruhe
DRAQ5	1:1000	Biostatus Limited, Leicestershire England

4.6.12 Abkürzungen

Allgemein

Abb.	Abbildung
AJ	<i>adherens junction</i>
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
d. h.	das heißt
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et aliae</i> und <i>et alii</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GJs	<i>gap junctions</i>
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hz	Hertz
k	Kilo-
kb	Kilobasenpaare
Da	Dalton
l	Liter
m	Milli-
min	Minuten
mind.	mindestens
n	Anzahl gezählter Individuen
NHS	<i>normal horse serum</i>
nm	Nanometer
μ	Mikro-
M	Molar
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>

nA	Nano-Ampere
NMJ	<i>neuromuscular junction</i> (Neuromuskuläre Verbindung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
POD	Peroxidase
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNase	Ribonuklease
sek	Sekunden
s. o.	siehe oben
SJs	<i>septate junctions</i>
ssDNA	Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
TJs	<i>tight junctions</i>
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

5 Referenzen

- Aberle H. et al.**, *wishful thinking* encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 33, 545-558 (2002).
- Adams MD. & Sekelsky JJ.**, From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 189-198 (2002).
- Adryan B.**, Funktionell-genomische Untersuchungen am Fibroblastenwachstumsfaktor *BRANCHLESS* in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Dissertation Braunschweig 2004.
- Affolter M. & Shilo BZ.**, Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 731-735 (2000).
- Alberts M.**, *Molecular Biology of The Cell*. 2002: Vierte Auflage. New York: Garland Publishing
- Allison RF. et al.**, Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of *tobacco-etch-virus*: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* 147, 309-316 (1985).
- Atwood HL., Govind CK. & Wu CF.**, Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J. Neurobiol.* 24, 1008-1024 (1993).
- Baumgartner S. et al.**, A *Drosophila* *neurexin* is required for *septate junction* and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* 87, 1059-1068 (1996).

- Behr M.,** Riedel D. & Schuh R., The claudin-like *megatrachea* is essential in *septate junctions* for the epithelial *barrier function* in *Drosophila*. Dev. Cell 5, 611-620 (2003).
- Behr M.,** Molekulare Analyse der tubulären Morphogenese in *Drosophila melanogaster*. Dissertation Braunschweig 2003.
- Bilder D.,** Li M. & Perrimon N., Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. Science 289, 113-116 (2000).
- Black JL III.,** The voltage-gated calcium channel gamma subunits: a review of the literature. J. Bioenerg. Biomembr. 35, 649-660 (2003).
- Bond-Matthews B. & Davidson N.,** Transcription from each of the *Drosophila* act5C leader exons is driven by a separate functional promoter. Gene 62, 289-300 (1988)
- Bourouis M. & Jarry B.,** Vectors containing a prokaryotic *dihydrofolate reductase* gene transform *Drosophila* cells to methotrexate-resistance. EMBO J 2, 1099-1104 (1983).
- Brand AH. & Perrimon N.,** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118, 401-415 (1993).
- Brooks IM. et al.,** Genetic analysis of a synaptic calcium channel in *Drosophila*: intragenic modifiers of a temperature-sensitive paralytic mutant of *cacophony*. Genetics 164, 163-171 (2003).

- Burgess DL. et al.,** A cluster of three novel Ca^{2+} channel gamma subunit genes on chromosome 19q13.4: evolution and expression profile of the gamma subunit gene family. *Genomics* 71, 339-350 (2001).
- Campos AR. et al.,** Molecular analysis of the locus *elav* in *Drosophila melanogaster*: a gene whose embryonic expression is neural specific. *EMBO J.* 6, 425-431 (1987).
- Carrington JC. & Dougherty WG.,** Processing of the *tobacco-etch-virus* 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160, 355-362 (1987).
- Carrington JC. & Dougherty WG.,** Small Nuclear Inclusion Protein Encoded by a Plant Potyvirus Genome Is a Protease. *J. Virol.* 61, 2540-2548 (1987).
- Carrington JC. & Dougherty WG.,** A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for *tobacco-etch-virus* polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3391-3395 (1988).
- Catterall WA.,** Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 521-555 (2000).
- Catterall WA.,** Seagar, MJ. & Takahashi, M., Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 263, 3535-3538 (1988).
- Catterall WA. et al.,** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacological Reviews* 55, 579-581 (2003).

- Cereijido M. et al.**, The making of a *tight junction*. J. Cell. Sci. Suppl. 17, 127-132 (1993).
- Curtis BM. & Catterall WA.**, Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. Biochemistry 23, 2113-2118 (1984).
- Dan I.**, Watanabe NM. & Kusumi A., The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. Trends in Cell Biology 11, 220-230 (2001).
- Devine L. et al.**, Orientation of the Ig domains of CD8 alpha beta relative to MHC class I. J. Immunol. 162, 846-851 (1999).
- Dickman D.**, Kurshan P. & Schwarz T., Mutations in a *Drosophila* $\alpha_2\delta$ Voltage-Gated Calcium Channel Subunit Reveal a Crucial Synaptic Function. J. Neurosci. 28, 31-38 (2008).
- Dietzl G. et al.**, A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. Nature 448, 151-156 (2007).
- Dougherty WG.**, Analysis of viral RNA isolated from *tobacco* leaf tissue infected with *tobacco-etch-virus*. Virology 131, 473-481 (1983).
- Dougherty WG. et al.**, Characterization of the catalytic residues of the *tobacco-etch-virus* 49-kDa proteinase. Virology 172, 302-310 (1989).
- Duffy JB.**, GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. genesis 34, 1-15 (2002).

- Fehon RG.,** Dawson, I. A. & Artavanis-Tsakonas, S., A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with *septate junctions* and is encoded by the *coracle* gene. *Development* 120, 545-557 (1994).
- Fukaya M. et al.,** Spatial diversity in gene expression for VDCC γ subunit family in developing and adult mouse brains. *Neuroscience Research* 53, 376-383 (2005).
- Furuse M. et al.,** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at *tight junctions* with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology* 141, 1539-1550 (1998).
- Gerlach N.,** Untersuchung der Claudin-Proteinfamilie in *Drosophila*. Dissertation Braunschweig 2006.
- Gielow ML.,** Gu GG. & Singh S., Resolution and pharmacological analysis of the voltage-dependent calcium channels of *Drosophila* larval muscles. *J. Neurosci.* 15, 6085-6093 (1995).
- Gilbert SF.,** *Developmental Biology*. 2000: Sechste Auflage. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Graf F.,** Noirot-Timothee C. & Noirot C., The specialization of *septate junctions* in regions of tricellular junctions. I. Smooth *septate junctions* (=continuous junctions). *J. Ultrastruct. Res.* 78, 136-151 (1982).
- Greenspan RJ.,** *Fly Pushing*. 2004: Zweite Auflage. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

- Han C. et al.,** *Drosophila* glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. *Development* 132, 667-679 (2005).
- Hansen J. et al.,** Calcium channel β subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37, 1147-1158 (2004).
- Ito K. et al.,** The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771 (1997).
- Kapust RB. et al.,** The P1' specificity of *tobacco-etch-virus* protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 949-955 (2002).
- Kawasaki F. et al.,** Active Zone Localization of Presynaptic Calcium Channels Encoded by the *cacophony* Locus of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 24, 282-285 (2004).
- Kawasaki F., Collins SC. & Ordway RW.,** Synaptic calcium-channel function in *Drosophila*: analysis and transformation rescue of temperature-sensitive paralytic and lethal mutations of *cacophony*. *J. Neurosci.* 22, 5856-5864 (2002).
- Kennerdell JR. & Carthew RW.,** Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat. Biotechnol.* 18, 896-898 (2000).
- Kittel RJ. et al.,** Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312, 1051-1054 (2006).

- Krause C.**, Not the outside but the inside matters: Functional analysis of Capricious and Tartan during *Drosophila* tracheal morphogenesis. Dissertation Kassel 2003.
- Kühnlein RP. & Schuh R.**, Dual function of the region-specific homeotic gene spalt during *Drosophila* tracheal system development. *Development* 122, 2215-2223 (1996).
- Kurdyak P. et al.**, Differential physiology and morphology of motor axons to ventral longitudinal muscles in larval *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* 350, 463-472 (1994).
- Lauf U. et al.**, Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to *gap junctions* in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10446-10451 (2002).
- Lee T. & Luo L.**, Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22, 451-461 (1999).
- Letts VA. et al.**, The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat. Genet.* 19, 340-347 (1998).
- Littleton JT. & Ganetzky B.**, Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26, 35-43 (2000).
- Luschnig S. et al.**, *serpentine* and *vermiform* encode matrix proteins with chitin binding and deacetylation domains that limit tracheal tube length in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 16, 186-194 (2006).

- MacPherson MR.** *et al.*, Model organisms: new insights into ion channel and transporter function. L-type calcium channels regulate epithelial fluid transport in *Drosophila melanogaster*. Am. J. Physiol., Cell. Physiol. 280, C394-C407 (2001).
- Manning G. & Krasnow MA.**, in Bate M. & Martinez Arias A., The Development of *Drosophila melanogaster*. 1993: S. 609-685, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mochida S.** *et al.*, Regulation of presynaptic Ca(V)2.1 channels by Ca²⁺ sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. Neuron 57, 210-216 (2008).
- Morita K.** *et al.*, Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes *tight junction* strands in endothelial cells. The Journal of Cell Biology 147, 185-194 (1999).
- Nagai T.** *et al.*, A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat. Biotechnol. 20, 87-90 (2002).
- Nallamsetty S.** *et al.*, Efficient site-specific processing of fusion proteins by *tobacco vein mottling virus* protease *in vivo* and *in vitro*. Protein Expression and Purification 38, 108-115 (2004).
- Nambu PA. & Nambu JR.**, The *Drosophila* fish-hook gene encodes a HMG domain protein essential for segmentation and CNS development. Development 122, 3467-3475 (1996).
- Neher E.**, Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. Neuron 20, 389-399 (1998).

- Noirot-Timothee C.**, Graf F. & Noirot C., The specialization of *septate junctions* in regions of tricellular junctions. II. *Pleated septate junctions*. J. Ultrastruct. Res. 78, 152-165 (1982).
- Oda H. et al.**, Identification of a *Drosophila* homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. The Journal of Cell Biology 121, 1133-1140 (1993).
- Peacock RE.**, Keen TJ. & Inglehearn CF., Analysis of a human gene homologous to rat ventral prostate.1 protein. Genomics 46, 443-449 (1997).
- Phan J. et al.**, Structural basis for the substrate specificity of *tobacco-etch-virus* protease. J. Biol. Chem. 277, 50564-50572 (2002).
- Rettig J. & Neher E.**, Emerging roles of presynaptic proteins in Ca^{++} -triggered exocytosis. Science 298, 781-785 (2002).
- Rheuben MB.**, Yoshihara, M. & Kidokoro, Y., Ultrastructural correlates of *neuromuscular junction* development. Int. Rev. Neurobiol. 43, 69-92 (1999).
- Rodesch CK. & Broadie K.**, Genetic studies in *Drosophila*: vesicle pools and cytoskeleton-based regulation of synaptic transmission. Neuroreport 11, R45-R53 (2000).
- Rose D. & Chiba A.**, Synaptic target recognition at *Drosophila neuromuscular junctions*. Microsc. Res. Tech. 49, 3-13 (2000).

- Russell SR.** *et al.*, The *Dichaete* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a SOX-domain protein required for embryonic segmentation. *Development* 122, 3669-3676 (1996).
- Sambrook J.**, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 1989: Zweite Auflage. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanes JR. & Lichtman JW.**, Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 791-805 (2001).
- Schneggenburger R. & Neher E.**, Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Current Opinion in Neurobiology* 15, 266-274 (2005).
- Schneggenburger R.**, Sakaba, T. & Neher, E. Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci.* 25, 206-212 (2002).
- Schuster CM.**, *et al.*, Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17, 641-654 (1996).
- Seyffert W.**, *Lehrbuch der Genetik*. 1998: Erste Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer
- Shaner NC.**, Steinbach P. & Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Meth.* 2, 905-909 (2005).
- Shiga Y.**, Tanaka-Matakatsu M. & Hayashi S., A nuclear GFP/ β -galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living *Drosophila*. *Develop. Growth Differ.* 38, 99-106 (1996).

- Sigrist SJ. et al.,** Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of *neuromuscular junctions*. *Nature* 405, 1062-1065 (2000).
- Steinlein OK. & Noebels JL.,** Ion channels and epilepsy in man and mouse. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 286-291 (2000).
- Strange K., Denton J. & Nehrke K.,** Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume. *Physiology (Bethesda, Md)* 21, 61-68 (2006).
- Tepass U. & Hartenstein V.,** The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 161, 563-596 (1994).
- Tepass U. et al.,** Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 35, 747-784 (2001).
- Tepass U., Theres C. & Knust E.,** *crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799 (1990).
- Tonning A. et al.,** A Transient Luminal Chitinous Matrix Is Required to Model Epithelial Tube Diameter in the *Drosophila* Trachea. *Dev. Cell* 9, 423-430 (2005).
- Tsien RY.,** The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544 (1998).
- Tsukita S. & Furuse M.,** Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 531-536 (2002).

- Uv A. & Samakovlis C.**, in Gilbert LL, Iatrou K., & Gill SS., Comprehensive Molecular Insect Science. S. 251-289 Vol. 2, 2004: Erste Auflage. Amsterdam: Elsevier
- Van Itallie CM. & Anderson JM.**, The molecular physiology of *tight junction* pores. Physiology (Bethesda, Md) 19, 331-338 (2004).
- Varadi G. et al.**, Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drug action. Trends Pharmacol. Sci. 16, 43-49 (1995).
- Voie AM.**, Cohen S. & Celis JE., Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd edition, Vol. 3, 1998. San Diego: Academic Press
- Wang S. et al.**, *septate-junction*-Dependent Luminal Deposition of Chitin Deacetylases Restricts Tube Elongation in the *Drosophila* Trachea. Current Biology 16, 180-185 (2006).
- Woods DF. et al.**, Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. The Journal of Cell Biology 134, 1469-1482 (1996).
- Woods DF.**, Wu JW. & Bryant PJ., Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. Dev. Genet. 20, 111-118 (1997).
- Wolpert L.**, Principles of Development. 1998: Erste Auflage. Oxford: Oxford University Press

Wu VM. et al., Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. The Journal of Cell Biology 164, 313-323 (2004).

Xu T. & Rubin GM., Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. Development 117, 1223-1237 (1993).

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die *tobacco-etch-virus*- (TEV-) Protease in *Drosophila* verwendet und als Methode etabliert, um Proteine *in vivo* posttranslational an einer artifiziellen TEV-Protease-Zielsequenz zu spalten. Das TEV-Protease-System wurde von mir in Zellkultur erprobt und in *Drosophila* weiterentwickelt. Dort zeigte sich eine spezifische TEV-Protease-Aktivität, durch die eine zelluläre Misslokalisierung von abgespaltenen Proteinabschnitten erreicht wurde. Anschließend studierte ich das Transmembranprotein Mega und zeigte, dass sich TEV-Protease-vermittelt seine Funktion stören lässt und dadurch tracheale *mega*-Phänokopien erzeugt werden. So wurde eine funktionelle Trennung des Mega-C-Terminus von der Mega-Gesamtfunktion möglich. Mega ist als Claudin für die Ausbildung der transepithelialen Barriere, der *septate junctions* und an einer normalen trachealen Morphogenese beteiligt. Es zeigte sich durch TEV-Protease-gestützte Analysen, dass der Mega-C-Terminus essenziell für die Exozytose wichtiger Deacetylasen ist. Durch das Abspalten des Mega-C-Terminus kam es zur Störung dieser Exozytose und zu trachealen *mega*-Phänokopien, die bisher nur von *mega*-Funktionsverlustmutanten bekannt waren. Diese Phänokopien äußerten sich im Gegensatz zu *mega*-Mutanten jedoch nicht im Verlust der transepithelialen Barriere oder der Zerstörung der *septate junctions*. Somit konnte in *Drosophila* eine neue Methode entwickelt werden, die nun gewebe- und zeitabhängig *in vivo* Studien von Proteinen und Proteinkomplexen ermöglicht.

In *Drosophila* ist über die genaue Funktion von Synapsen wenig bekannt. In meiner Arbeit konnte Hot Dog als erste, putative Calcium-Kanal Gamma Untereinheit in *Drosophila* identifiziert werden. Untersuchungen zeigten, dass das Hot Dog-Protein die Reizweiterleitung von Motorneuronen in *Drosophila* moduliert. Durch die Lokalisation des Hot Dog-Proteins konnten darüber hinaus neuartige, physiologisch abgegrenzte Subzonen an der neuromuskulären Verbindung von *Drosophila* entdeckt werden.

